

EMERSON WANDER SILVA SOARES

A PERDA CONCOMITANTE DA HETEROZIGOSE DOS  
GENES *BRCA1* E *FHIT* COMO UM FATOR PROGNÓSTICO NO CÂNCER  
ESPORÁDICO DE MAMA

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de  
Ciências da Saúde da Universidade Federal  
do Paraná, como requisito parcial à obtenção  
do grau de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Jorge E. F. Matias

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Enilze M. S. F.  
Ribeiro

Coordenador: Prof. Dr. Antonio C. L. Campos

CURITIBA

2009



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA  
NÍVEL MESTRADO - DOUTORADO

**PARECER CONJUNTO DA BANCA EXAMINADORA  
DA AVALIAÇÃO DA DEFESA DE DOUTORADO**

Aluno **EMERSON WANDER SILVA SOARES**

Título da Tese: A PERDA CONCOMITANTE DA HETEROZIGOSE DOS GENES  
*BRCA1* E *FHIT* COMO UM FATOR PROGNÓSTICO NO CÂNCER ESPORÁDICO  
DE MAMA.

**CONCEITOS EMITIDOS:**

Prof. Dr. Alfredo Carlos S. D. de Barros	conceito emitido	A	equivalência	10
Prof. Dr. Cícero de Andrade Urban	conceito emitido	A	equivalência	10
Profa. Dra. Enilze Maria de S. F. Ribeiro	conceito emitido	A	equivalência	10
Prof. Dr. Flávio Daniel S. Tomasich	conceito emitido	A	equivalência	10
Prof. Dr. Antonio Carlos L. Campos	conceito emitido	A	equivalência	10

**Conceito Final de Avaliação:**

Conceito: \_\_\_\_\_ Equivalência: \_\_\_\_\_

Curitiba, 18 de dezembro de 2009.

Prof. Dr. Alfredo Carlos S. D. de Barros

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Cícero de Andrade Urban

\_\_\_\_\_

Profa. Dra. Enilze Maria de S. F. Ribeiro

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Flávio Daniel S. Tomasich

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Antonio Carlos L. Campos

\_\_\_\_\_

Aos meus pais, Aprígio e Bárbara, porque ousaram  
sonhar.

À minha esposa, Silviane, sempre presente na  
construção da minha vida.

Às minhas filhas, Malu e Daniela, pela  
perspectiva do futuro.

A vocês dedico esta obra com  
imenso carinho.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, saúde, bênção e proteção.

Ao Professor Jorge Eduardo Fouto Matias, pela oportunidade, crédito, orientação e correção desta tese.

À Professora Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro, pela oportunidade, crédito e inestimável colaboração em todas as etapas deste projeto.

Ao Professor Iglenir João Cavalli, pelo apoio na análise estatística, entusiasmo e sugestões sempre acertadas na realização deste trabalho.

À Savana Camillo de Lima Santos e demais funcionários do laboratório de Citogenética da Universidade Federal do Paraná pela dedicação e competência profissional na purificação do DNA e identificação da LOH nas amostras.

Ao Dr. Alexandre Galvão Bueno, por sua amizade, parceria e principalmente, extrema competência na extração e análise das amostras de tecido.

A UOPECCAN, na pessoa do seu presidente, o Sr. Ciro Antônio Kreuz, pelo incentivo à pesquisa científica e à qualificação de seus profissionais.

Ao Dr. Reginaldo José Andrade, pelas valiosas observações que permitiram o aprimoramento final deste trabalho.

Aos técnicos colaboradores Valmir Dalla Pozza e Fátima Cândida da Silva, pelo trabalho árduo prestado no instituto de anatomia patológica – Anatom.

Ao Dr. Manuel Ayres, pela colaboração e orientação na utilização do seu programa estatístico BioEstat®.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

Ao Professor Calixto Antônio Hakim Neto, porque este jamais será esquecido nas minhas listas de agradecimentos.

É impossível para um homem aprender aquilo  
que ele acha que já sabe.

**Epíteto** (55 d.C. – 135 d.C.)

Cada característica herdada é definida por um  
par de genes. Os genes dos pais são  
separados ao acaso nos gametas, de forma  
que cada gameta possui apenas um gene do  
par. Então, quando as células sexuais se  
unem na fertilização, os descendentes herdam  
um alelo de cada progenitor.

*Primeira lei de* **Gregor Mendel**, 1865

## RESUMO

Estudos anteriores demonstraram a perda da heterozigose (LOH) dos genes *BRCA1* e *FHIT* no câncer esporádico de mama. O objetivo deste estudo foi pesquisar a perda concomitante da heterozigose dos genes *BRCA1* e *FHIT* no câncer esporádico de mama e investigar o impacto deste fato na sobrevida das pacientes. A LOH foi determinada em tecido tumoral previamente fixado em formalina de 82 pacientes com câncer de mama, pela utilização de três marcadores de microssatélites para cada gene. A frequência de LOH foi relacionada com fatores prognósticos para o câncer de mama, já estabelecidos na literatura, como idade, comprometimento de linfonodos axilares, tamanho tumoral, grau histológico, invasão angiolinfática, expressão do HER2 e *status* hormonal. A análise dos casos informativos (72) demonstrou a presença da LOH em ambos os locos, *BRCA1* e *FHIT*, em 24 pacientes (33,3%), a ausência de LOH em ambos os locos em 23 pacientes (32%) e a presença de LOH em ao menos um loco em 25 pacientes (34,7%). A LOH concomitante nos genes *BRCA1* e *FHIT* apresentou associação com tumores maiores ( $P < 0,01$ ), axila comprometida ( $P = 0,01$ ), grau histológico 3 ( $P < 0,01$ ), presença de invasão angiolinfática ( $P = 0,01$ ) e receptor hormonal negativo ( $P = 0,02$ ). Após seguimento médio de 48 meses, as pacientes com LOH concomitante apresentaram menor sobrevida ( $P < 0,02$  pelo teste LOG-rank;  $P < 0,05$  pelo teste de COX: modelo de risco proporcional, com *hazard ratio* de 4,99) em relação às pacientes sem LOH. Portanto, a LOH concomitante dos genes *BRCA1* e *FHIT* foi um fator prognóstico independente das demais variáveis. Estas observações sugerem que a perda concomitante de alelos destes genes esteja associada a tumores mamários mais agressivos e com pior prognóstico.

Palavras-chave: Câncer esporádico de mama. Perda da heterozigose. *BRCA1*. *FHIT*. Fator prognóstico.

## ABSTRACT

Previous studies have shown loss of heterozygosity (LOH) at the *BRCA1* and *FHIT* genes in sporadic primary breast cancer. The aim of this study was to evaluate the concomitant loss of heterozygosity at the *BRCA1* and *FHIT* genes in sporadic breast cancer and investigate its impact on patients survival. LOH was determined in formalin-fixed tumor tissue from 82 breast cancer patients using three microsatellite markers in each locus. The LOH frequency was related with standard breast cancer prognostics factors, such as age, axillary nodal involvement, tumor size, histologic grade, lymphovascular invasion, HER2 expression and hormone receptor status. The analysis on the informative cases (72) showed the presence of LOH at both the *BRCA1* and *FHIT* loci in 24 patients (33,3%), the absence of LOH at both loci in 23 patients (32%), and the presence of LOH at one of the loci in 25 patients (34,7%). The concomitant LOH presence, at *FHIT* and *BRCA1* loci, was associated with large tumors ( $P < 0,01$ ), axillary nodal involvement ( $P = 0,01$ ), histologic grade 3 ( $P < 0,01$ ), lymphovascular invasion ( $P = 0,01$ ) and negative hormone receptor ( $P = 0,02$ ). After a median follow-up of 48 months, the patients with concomitant LOH had lower survival ( $P < 0,02$  by LOG-rank test;  $P < 0,05$  by COX proportional-hazards model, with a hazard ratio of 4,99) as compared with patients without LOH. Therefore, concomitant LOH at the *BRCA1* and *FHIT* genes was an independent prognostic factor from the others variables. These observations suggest that the concomitant allelic losses of those genes are associated with more aggressive breast tumors and with a poor prognosis.

Key words: Sporadic breast cancer. LOH. *BRCA1*. *FHIT*. Prognostic factor.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FOTOGRAFIA 1	– IDENTIFICAÇÃO DAS ÁREAS DE TUMOR (T) E NÃO TUMOR (NT) NO BLOCO DE PARAFINA.....	37
QUADRO 1	– DESCRIÇÃO DOS SEIS MARCADORES DE MICROSSATÉLITES.....	39
QUADRO 2	– COMPOSIÇÃO DA MISTURA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....	40
FOTOGRAFIA 2	– EXEMPLO DE AMPLIFICAÇÃO DO DNA EM GEL POLIACRILAMIDA 4,25% PARA OS MARCADORES DOS GENES <i>BRCA1</i> E <i>FHIT</i> .....	40
FIGURA 1	– EXEMPLO DE LOH DO GENE <i>FHIT</i> NO TECIDO TUMORAL (ALELO 1) COM O MARCADOR D3S1300.....	42
GRÁFICO 1	– CURVAS DE SOBREVIDA (5 ANOS) DE KAPLAN-MEIER EM RELAÇÃO À LOH.....	49
GRÁFICO 2	– SOBREVIDA: ANÁLISE UNIVARIADA PARA LOH.....	51
GRÁFICO 3	– SOBREVIDA: ANÁLISE UNIVARIADA PARA IDADE.....	51
GRÁFICO 4	– SOBREVIDA: ANÁLISE UNIVARIADA PARA TAMANHO DO TUMOR.....	52
GRÁFICO 5	– SOBREVIDA: ANÁLISE UNIVARIADA PARA GRAU HISTOLÓGICO.....	52
GRÁFICO 6	– SOBREVIDA: ANÁLISE UNIVARIADA PARA STATUS AXILAR.....	53
GRÁFICO 7	– SOBREVIDA: ANÁLISE UNIVARIADA PARA INVASÃO ANGIOLINFÁTICA.....	53
GRÁFICO 8	– SOBREVIDA: ANÁLISE UNIVARIADA PARA RECEPTOR HORMONAL (ESTROGÊNIO E/OU PROGESTERONA).....	54
GRÁFICO 9	– SOBREVIDA: ANÁLISE UNIVARIADA PARA SUPEREXPRESSÃO DA PROTEÍNA HER2.....	54
GRÁFICO 10	– SOBREVIDA: ANÁLISE MULTIVARIADA PARA LOH.....	56



GRÁFICO 11	– SOBREVIDA: ANÁLISE MULTIVARIADA PARA TAMANHO DO TUMOR.....	56
GRÁFICO 12	– SOBREVIDA: ANÁLISE MULTIVARIADA PARA GRAU HISTOLÓGICO.....	57
GRÁFICO 13	– SOBREVIDA: ANÁLISE MULTIVARIADA PARA IDADE.....	57
GRÁFICO 14	– SOBREVIDA: ANÁLISE MULTIVARIADA PARA STATUS AXILAR.....	58
GRÁFICO 15	– SOBREVIDA: ANÁLISE MULTIVARIADA PARA INVASÃO ANGIOLINFÁTICA.....	58
GRÁFICO 16	– SOBREVIDA: ANÁLISE MULTIVARIADA PARA RECEPTOR HORMONAL (ESTROGÊNIO E/OU PROGESTERONA).....	59
GRÁFICO 17	– SOBREVIDA: ANÁLISE MULTIVARIADA PARA SUPEREXPRESSION DA PROTEÍNA HER2.....	59

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DO TRATAMENTO.....	44
TABELA 2 –	FREQUÊNCIA DE LOH PARA OS MARCADORES.....	45
TABELA 3 –	FREQUÊNCIA DE LOH PARA OS GENES <i>BRCA1</i> E <i>FHIT</i> .....	45
TABELA 4 –	AGRUPAMENTO DAS 72 PACIENTES INFORMATIVAS EM RELAÇÃO À LOH NOS GENES <i>BRCA1</i> E <i>FHIT</i> .....	46
TABELA 5 –	RELAÇÃO ENTRE A LOH CONCOMITANTE E AS DEMAIS VARIÁVEIS.....	47
TABELA 6 –	RELAÇÃO ENTRE A LOH EM APENAS UM GENE E AS DEMAIS VARIÁVEIS.....	48
TABELA 7 –	PROBABILIDADE DE SOBREVIDA EM 5 ANOS PELA CURVA DE KAPLAN-MEIER.....	50
TABELA 8 –	ANÁLISE UNIVARIADA DA SOBREVIDA PELO TESTE LOG-RANK.....	50
TABELA 9 –	ANÁLISE MULTIVARIADA DA SOBREVIDA PELO TESTE DE COX: MODELO DE RISCO PROPORCIONAL.....	55

## LISTA DE SIGLAS

AA	-	ausência de LOH nos genes <i>BRCA1</i> e <i>FHIT</i>
A <sub>B</sub> P <sub>F</sub>	-	ausência de LOH no gene <i>BRCA1</i> e presença de LOH no gene <i>FHIT</i>
AC	-	adriplastina + ciclofosfamida
Ap3A	-	dinucleosídeo trifosfato hidrolase
AP+PA	-	A <sub>B</sub> P <sub>F</sub> + P <sub>B</sub> A <sub>F</sub>
ASCO	-	American Society of Clinical Oncology
BASC	-	complexo de vigilância do genoma <i>BRCA1</i> -associados
<i>BRCA1</i>	-	gene Breast Cancer 1
BRCA1	-	proteína BRCA1
<i>BRCA2</i>	-	gene Breast Cancer 2
CAF	-	ciclofosfamida + adriplastina + fluorouracil
<i>CCND1</i>	-	gene ciclina D1
CDI	-	carcinoma ductal infiltrante
<i>CDK2</i>	-	gene Cyclin-Dependent Kinase 2
cGy	-	unidade de radiação centigray
<i>CHEK2</i>	-	gene Checkpoint Kinase 2
CMF	-	ciclofosfamida + metotrexate + fluorouracil
COX2	-	prostaglandina ciclo-oxigenase 2
CpG	-	citosina que precede guanina
DNA	-	ácido desoxirribonucléico
dNTP	-	desoxirribonucleotídeo trifosfato
E	-	estrogênio
<i>EGFR</i>	-	gene Epidermal Growth Factor Receptor
<i>FHIT</i>	-	gene Fragile Histidine Triad
FHIT	-	proteína FHIT (tríade frágil da histidina)
FISH	-	fluorescent in situ hybridization
<i>FRA3B</i>	-	common chromosome fragile site 3B
HE	-	hematoxilina e eosina
<i>HER2</i>	-	oncogene Human Epidermal Growth Factor Receptor-Type 2
HER2	-	glicoproteína HER2
<i>HOXB13</i>	-	gene Homeobox B13
IA	-	inibidor da aromatase

IAL	-	invasão angiolinfática
IC	-	intervalo de confiança
IL17BR	-	gene Interleukin 17 receptor B
kb	-	quilobase
KDa	-	quiloDalton
LOH	-	Loss of Heterozygosity (perda da heterozigose)
Mb	-	Megabase
miR21	-	micro RNA 21
<i>MMAC1</i>	-	gene Mutated in Multiple Advanced Cancers 1
mRNA	-	RNA mensageiro
<i>MYC</i>	-	oncogene Myelocytomatosis
ND	-	não determinados
NEJM	-	New England Journal of Medicine
NI	-	não informativos
$P_{B\text{A}_F}$	-	presença de LOH no gene <i>BRCA1</i> e ausência de LOH no gene <i>FHIT</i>
PP	-	presença de LOH concomitante nos genes <i>BRCA1</i> e <i>FHIT</i>
<i>PTEN</i>	-	gene Phosphatase and Tensin Homolog
<i>p16</i>	-	gene Cyclin-dependent Inhibitor Kinase 2A (CDKN2A)
p53	-	proteína p53
<i>Rb1</i>	-	gene Retinoblastoma 1 (Rb)
RE	-	receptor de estrogênio
RH	-	receptor hormonal
RP	-	receptor de progesterona
rpm	-	rotações por minuto
SDS	-	sulfato dodecil de sódio
SEER	-	Surveillance, Epidemiology and End Results
SOE	-	sem outra especificação
STR	-	short tandem repeats
TMX	-	tamoxifeno
<i>TP53</i>	-	gene Tumor Protein 53
UFPR	-	Universidade Federal do Paraná
WWOX	-	proteína WW domain containing oxidoreductase

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1.1 OBJETIVOS.....	17
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
2.1 DA CITOGENÉTICA À GENÉTICA MOLECULAR NA ONCOGÊNESE MAMÁRIA.....	18
2.1.1 Oncogenes – década de 1980.....	19
2.1.2 Genes supressores tumorais – década de 1990.....	19
2.1.3 MicroRNAs – primeira década do século XXI.....	21
2.2 GENE <i>BRCA1</i> .....	21
2.2.1 O gene <i>BRCA1</i> e o câncer esporádico de mama.....	22
2.3 GENE <i>FHIT</i> .....	26
2.3.1 O gene <i>FHIT</i> e o câncer de mama.....	27
2.4 RELAÇÃO ENTRE OS GENES <i>BRCA1</i> E <i>FHIT</i> .....	30
<b>3 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	31
3.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	32
3.3 ASPECTOS ÉTICOS.....	32
3.4 TRATAMENTO.....	33
3.4.1 Cirurgia.....	33
3.4.2 Quimioterapia.....	33
3.4.3 Radioterapia.....	33
3.4.4 Hormonioterapia.....	34
3.5 SEGUIMENTO.....	34
3.6 DETERMINAÇÃO DAS VARIÁVEIS.....	35
3.6.1 Tamanho do tumor.....	35
3.6.2 Graduação histológica.....	35
3.6.3 Invasão angiolinfática.....	35
3.6.4 <i>Status</i> axilar.....	35
3.6.5 Receptor hormonal.....	36
3.6.6 Superexpressão da proteína HER2.....	36
3.7 OBTENÇÃO E EXTRAÇÃO DO DNA.....	36
3.8 AMPLIFICAÇÃO DO DNA POR PCR.....	38

3.8.1 Análise dos produtos da PCR.....	40
3.9 ANÁLISE DA PERDA DE HETEROZIGOSE.....	41
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
4.1 CARACTERÍSTICAS DAS PACIENTES.....	43
4.2 FREQUÊNCIA DE LOH NOS GENES <i>BRCA1</i> E <i>FHIT</i> .....	45
4.3 RELAÇÃO DA LOH COM AS DEMAIS VARIÁVEIS.....	46
4.4 SOBREVIDA DAS 72 PACIENTES INFORMATIVAS.....	48
4.5 METÁSTASES À DISTÂNCIA.....	60
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
5.1 FORMULAÇÃO DA HIPÓTESE.....	61
5.1.1 O gene <i>BRCA1</i> e o câncer esporádico de mama.....	61
5.1.2 Relação <i>BRCA1:FHIT</i> .....	63
5.2 SOBRE AS PACIENTES.....	64
5.3 SOBRE O MÉTODO.....	65
5.3.1 Extração de DNA em tecido fixado.....	65
5.3.2 Os marcadores e as 10 pacientes não informativas.....	66
5.4 SOBRE OS RESULTADOS.....	67
5.4.1 LOH dos genes <i>BRCA1</i> e <i>FHIT</i> .....	67
5.4.2 Relação da LOH concomitante com as demais variáveis.....	68
5.4.3 Sobrevida: análise univariada.....	68
5.4.4 Sobrevida: análise multivariada.....	69
5.5 ATRIBUTOS DE UMA PESQUISA DE MARCADOR PROGNÓSTICO.....	69
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>72</b>
<b>DOCUMENTOS CONSULTADOS.....</b>	<b>81</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>82</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>91</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Dados epidemiológicos do ano 2007 demonstraram ser o câncer de mama a neoplasia maligna mais comum entre as mulheres, com 1,3 milhões de novos casos diagnosticados em todo o mundo. Responsável por 465 mil mortes ao ano, representava, nessa data, a principal causa de morte por câncer entre as mulheres (GARCIA *et al*, 2007). No Brasil, segundo estimativas do Ministério da Saúde, em 2008 foram registrados 49,4 mil casos novos de câncer de mama, com um risco estimado de 51 casos a cada 100 mil mulheres. Nas regiões sul e sudeste, onde a incidência é maior, este risco aumenta para 68 casos novos por 100 mil mulheres (INCA, 2008).

Uma característica marcante do câncer de mama é a diversidade de comportamento com relação à evolução, resposta ao tratamento e agressividade. Em 1905, Steinthal, um médico alemão, constatou que tumores mamários menores, diagnosticados em fase inicial, apresentavam maior chance de cura (HAAGENSEN<sup>1</sup>, 1956, *apud* SINGLETARY; SENER, 2004). Em 1942, Pierre Denoix, criou o estadiamento TNM, atualmente na sua sexta edição (GREENE *et al.*, 2002), que levou em consideração o tamanho do tumor (T), o *status* linfonodal (N) e a presença de doença à distância (M). Esta foi a primeira tentativa de dividir o câncer de mama em estádios que representassem melhor a evolução da doença. Provando que Pierre Denoix estava certo, o tamanho do tumor e o *status* da axila continuam, até os dias atuais, como os principais fatores prognósticos no câncer de mama.

No entanto, outros estudos demonstraram que tumores de mama em um mesmo estágio TNM tinham comportamentos diversos com relação à capacidade de recidiva local e produção de metástases. Esta heterogeneidade gerou a necessidade de aprimoramento dos fatores prognósticos. Descobriram-se então, outros marcadores como tipo histológico, grau histológico, grau nuclear, presença de invasão angiolinfática, entre outros, que comprovadamente também influenciavam na evolução da doença (FITZGIBBONS *et al.*, 2000).

Como fator prognóstico e preditivo, ou seja, capaz de determinar a resposta ao tratamento, a identificação de receptores hormonais (estrogênio e progesterona)

---

<sup>1</sup> HAANGENSEN, C. D. Diseases of the breast. Philadelphia: W. B. Saunders, 1956.

e do oncogene *HER2* foram importantes avanços na compreensão da diversidade do comportamento biológico do câncer de mama (GOWN, 2008).

Nas últimas décadas, centenas de marcadores com potencial para atuarem como fatores prognósticos foram descritos como, por exemplo, a determinação dos níveis de ciclina E nas células tumorais (KEYOMARSI *et al.*, 2002), mas não alcançaram valor prático.

Atualmente, o estudo das alterações genéticas nas células tumorais parece ser o caminho mais promissor na busca por marcadores que auxiliem na determinação do comportamento biológico de um carcinoma mamário, já no seu diagnóstico. Neste grupo, dos fatores prognósticos de origem genética, a assinatura genética, pela técnica de *microarray*, que analisou 8,102 mil genes em 65 amostras tumorais, permitiu a identificação de diferentes perfis genéticos intrínsecos para o câncer de mama: luminais (A e B), HER2, basal-símile e tipo mama normal (PEROU *et al.*, 2000). Posteriormente, foram selecionados 70 genes para avaliação de alterações que, em conjunto, foram tão ou mais eficazes que o estadiamento TNM na determinação da evolução das pacientes (VAN DE VIJVER *et al.*, 2002). Este fato foi considerado um marco na transição entre a “medicina empírica e a molecular.” (SOTIRIOU; PUSZTAI, 2009, p. 790).

Outra forma de avaliar alterações no DNA das células tumorais é a pesquisa da perda da heterozigose (LOH) de certos locos do cromossomo. Callahan *et al.* (1993) demonstraram que a LOH é a alteração somática mais frequente nas células tumorais do câncer de mama, quando comparada com a amplificação do genoma. Determinaram que as regiões 3p e 17q estão entre as mais frequentemente mutadas. Por fim, o mais importante, definiram que a LOH é causa e não consequência da progressão dos tumores malignos de mama.

As regiões 3p e 17q apresentam, entre outros, os genes supressores tumorais *BRCA1* e *FHIT*. A inativação destes dois genes, por mutações ou epimutações, provoca instabilidade genética e epigenética, que resulta em novos danos não reparados em outros genes supressores e oncogenes, permitindo o crescimento celular descontrolado e surgimento do câncer (BREIVIK, 2005). A ocorrência de LOH nos genes *BRCA1* e *FHIT* no câncer esporádico de mama foi demonstrada em estudos prévios. A LOH do gene *BRCA1* ocorreu, em média, em 33% dos casos analisados (MIYAKIS; SPANDIDOS, 2002). Para o gene *FHIT*, a média foi de 40% (TEIXEIRA; PANDIS; HEIM, 2002). Nestas séries, os tumores com



LOH dos genes *BRCA1* ou *FHIT* apresentaram um comportamento mais agressivo, com tendência a pior prognóstico.

Até o momento, não se relacionou a LOH concomitante dos genes *BRCA1* e *FHIT* com outros marcadores prognósticos, nem se determinou eventual influência deste fato no comportamento biológico do câncer de mama.

## 1.1 OBJETIVOS

- a) determinar a frequência de LOH concomitante nos genes *BRCA1* e *FHIT* em pacientes com câncer esporádico de mama;
- b) avaliar a relação da LOH concomitante dos genes *BRCA1* e *FHIT* com os seguintes marcadores prognósticos para o câncer de mama: idade, grau histológico, tamanho do tumor, invasão angiolinfática, *status* axilar, receptor hormonal (RH) e HER2;
- c) avaliar e comparar a sobrevida das pacientes com e sem perda concomitante da heterozigose nos genes *BRCA1* e *FHIT*.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 DA CITOGENÉTICA À GENÉTICA MOLECULAR NA ONCOGÊNESE MAMÁRIA

As primeiras observações que alterações cariotípicas nos tumores sólidos não ocorriam ao acaso foram feitas por van Steenis (1966). Ele constatou que determinados cromossomos estavam sistematicamente em maior número e outros ausentes ao analisar tumores gástricos, uterinos, ovarianos e mamários. Levan (1967, p. 346) observou que as células tumorais poliplóides se adaptavam mais facilmente a ambientes extremos, assim como as espécies de plantas poliplóides, adaptadas a regiões desérticas, em relação às células e plantas diplóides, respectivamente. Ele considerou esta alteração do cariótipo uma “evolução” [?] celular, pois estas células poliplóides tinham a capacidade de sobreviverem e se multiplicarem em qualquer hospedeiro em que fossem implantadas.

A partir da década de 1970, com o surgimento de técnicas de bandeamento dos cromossomos humanos (CASPERSSON; ZECH; JOHANSSON, 1970) a citogenética apresentou grande desenvolvimento e passou a contribuir para o esclarecimento das aberrações cromossômicas envolvidas na etiologia do câncer. Entre as várias alterações cromossômicas descritas no câncer de mama, a alteração estrutural mais frequente é a deleção na região 3p14. Tanto as aberrações numéricas quanto as estruturais, embora heterogêneas, ocorrem, claramente, de forma não randomizada (TEIXEIRA; PANDIS; HEIM, 2002). Novos avanços ocorreram no estudo das alterações genéticas e expressão gênica no câncer de mama, com o surgimento de pesquisas para detecção de anomalias cromossômicas nas famílias com alto risco para a doença e clonagem dos genes envolvidos nas alterações cromossômicas, como *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* e *PTEN/MMAC1*. Além disso, foram identificados os oncogenes, os genes supressores de tumor e os genes microRNA. Estas três classes passaram a ser consideradas responsáveis pelos danos genéticos no desenvolvimento de um tumor maligno (CROCE, 2008). Uma alteração genética raramente é suficiente para o surgimento do câncer. As evidências apontam para um processo de múltiplos passos de alterações sequenciais em vários oncogenes, genes supressores e microRNAs na célula

cancerosa. Estas alterações cromossômicas geralmente são adquiridas no transcorrer da vida (somáticas) e menos frequentemente são hereditárias (germinativas) e resultam no câncer familiar.

### 2.1.1 Oncogenes – década de 1980

Os oncogenes codificam proteínas responsáveis pelo controle da proliferação, diferenciação e apoptose celular. A ativação dos oncogenes pode ocorrer tanto na fase de iniciação quanto na fase de progressão tumoral. Várias são as possibilidades de ativação dos oncogenes: por amplificação gênica, rearranjos cromossômicos estruturais, mutações de ponto nas sequências reguladoras ou codificadoras e, ainda, por inserção viral. As translocações e mutações podem ocorrer como eventos iniciais ou durante a progressão tumoral, enquanto a amplificação geralmente ocorre durante a progressão. Os produtos dos oncogenes podem ser classificados em seis grandes grupos: fatores de transcrição, remodeladores da cromatina, fatores de crescimento, receptores de fator de crescimento, transdutores de sinais e reguladores da apoptose. No câncer de mama foi demonstrada a amplificação de diferentes famílias de oncogenes como *MYC*, ciclina *D1* (*CCND1*) e *EGFR* (*HER2*) (CROCE, 2008).

### 2.1.2 Genes supressores tumorais – década de 1990

Os genes supressores codificam proteínas que fazem parte das vias de sinalização celular e atuam na inibição da proliferação, no retardo da progressão do ciclo, no bloqueio da diferenciação celular e na apoptose. Portanto, alterações que inativem estes genes liberam a célula, levando-a à proliferação desordenada, característica da célula cancerosa (WEINBERG, 1991). Levitt e Hickson (2002) dividiram os genes supressores em dois grupos: os *gatekeepers* que agem diretamente na regulação da proliferação celular e os *caretakers* que atuam na manutenção da integridade do genoma. Uma grande contribuição ao entendimento

dos genes supressores foi dada por Knudson Junior (1971) ao postular que o retinoblastoma, um raro tumor ocular da infância, era causado por duas mutações sucessivas no gene *Rb* (*Two hit model*). No retinoblastoma esporádico, observado em crianças sem história familiar da doença, este autor propôs a ocorrência de duas mutações somáticas nas células da retina. Para o retinoblastoma familiar, propôs que uma das mutações era transmitida por um dos pais e a outra era somática. O mecanismo descrito para o retinoblastoma se aplica a outros genes supressores: quando alelos mutados são transmitidos pela linhagem germinativa, eles conferem uma susceptibilidade herdada ao câncer e levam às formas familiares. Quando os alelos são inativados por mutações somáticas, desencadeiam formas esporádicas dos mesmos tumores.

Na inativação de genes supressores, as alterações cromossômicas podem envolver as regiões próximas ao gene. Assim, marcadores de DNA que demonstram heterozigose antes da progressão do tumor sofrem redução até atingirem a perda alélica total, mecanismo conhecido como perda da heterozigose ou LOH (WEINBERG, 1991).

A análise de microssatélites, que são sequências de DNA nas quais de dois a oito nucleotídeos são repetidos várias vezes (*short tandem repeats* – STR), é um método bastante informativo na pesquisa da LOH e amplamente utilizado para detectar deleções genéticas submicroscópicas. Sendo assim, a detecção de LOH persistente em um loco específico é um método indireto de pesquisa sobre a possível localização de um gene supressor de tumor envolvido na patogênese da doença (MIYAKIS; SPANDIDOS, 2002). O primeiro gene supressor tumoral sabidamente associado ao câncer de mama foi denominado *TP53* (loco 17p13). Mutações nesse loco foram observadas em famílias com a síndrome de Li-Fraumeni (MALKIN *et al.*, 1990). Outros genes supressores ligados ao câncer de mama hereditário são os *BRCA1* (17q21), *BRCA2* (13q12-13) e *PTEN* (10q23). Já os genes *Rb1*, *p16*, *FHIT* e *E-caderina*, também considerados supressores, foram relacionados ao câncer mamário esporádico.

### 2.1.3 MicroRNAs – primeira década do século XXI

Os genes que codificam microRNAs não são traduzidos em proteínas. Eles produzem uma cadeia simples de RNA com 18 a 25 nucleotídeos com a função de regular a expressão do gene. O mapeamento dos microRNAs demonstrou que metade desses genes estão localizados em sítios frágeis do cromossomo, regiões de perda de heterozigose, ou sujeitas a rearranjos, deleções e ampliações nas células cancerosas (CALIN *et al.*, 2004). Portanto, as regiões do genoma envolvidas em rearranjos cromossômicos nas células cancerosas, mas que não apresentam oncogenes ou genes supressores, hospedam genes codificadores de microRNAs, cuja função depende do tecido em que eles se encontrem. Sua atuação pode ser como supressor tumoral se o alvo for bloquear um oncogene, ou agir como oncogene, ao se ligar a um gene supressor. Como exemplo, o microRNA *miR21* inibe a expressão do gene supressor *PTEN*. O *PTEN* codifica uma fosfatase envolvida na via de sinalização da quinase PI3K que está deletada, mutada ou inativada no câncer avançado de mama, pulmão, estômago e próstata (MENG *et al.*, 2006). Espera-se que, futuramente, essa classe de genes possa ser utilizada como marcador biológico e alvo terapêutico para diferentes tipos de câncer, inclusive o de mama.

### 2.2 GENE *BRCA1*

O estudo de 23 famílias cujos membros (homens e mulheres), ainda jovens, apresentaram 146 casos de câncer de mama, uma incidência acima da média da população, resultou no mapeamento do primeiro gene de predisposição ao câncer de mama, denominado *BRCA1* (*Breast Cancer 1*), no loco 17q21 (HALL *et al.*, 1990). Posteriormente, este gene foi isolado e clonado por Miki *et al.* (1994). O gene *BRCA1* é transcrito em RNA mensageiro (mRNA) com 5,711 mil pares de bases, agrupados em 24 éxons, dos quais 22 são codificados. A codificação gera uma proteína de 220 kDa, com 1,863 mil aminoácidos, localizada no núcleo das células epiteliais.

A função do gene *BRCA1* é regulada pela fosforilação. A proteína BRCA1 é hiperfosforilada no final da fase G1 e no início da fase S por meio da atividade de uma quinase endógena, composta por um complexo ciclina-CDK2 que controla a transição G1-S, com a desfosforilação ocorrendo na fase M do ciclo celular (RUFFNER *et al.*, 1999).

Vários estudos sobre o comportamento do gene *BRCA1* permitiram a sua classificação como um gene supressor tumoral do tipo *caretaker* (KINZLER; VOGELSTEIN, 1997), que mantém a estabilidade do genoma. Para isso, sua proteína se junta com a proteína de outros genes supressores tumorais, sensores de danos ao DNA e transdutores de sinal para formar um grande complexo protéico com várias subunidades, conhecido como complexo de vigilância do genoma *BRCA1*-associados (BASC). Este produto do gene se liga com a RNA polimerase II e, pelo domínio C-terminal, também interage com os complexos de histona e deacetilase (LEVITT; HICKSON, 2002).

O gene *BRCA1* atua no reparo de quebras da dupla fita de DNA, na transcrição, apoptose, controle dos pontos de checagem do ciclo celular e recombinações. Segundo Lee e Boyer (2001), a inativação do gene *BRCA1* torna mama e ovário susceptíveis aos efeitos tecido-específicos dos danos no DNA induzidos pelo estrógeno, pois a proteína BRCA1 tem o papel de reprimir a atividade transcricional dos receptores de estrógeno e progesterona. Quando isto não ocorre, há uma aceleração da proliferação celular nestes órgãos. Deste modo, o *BRCA1* atua para evitar tanto a iniciação quanto a progressão do câncer.

As mutações no gene *BRCA1* ocorrem em, aproximadamente, 20% dos cânceres de mama de origem familiar. Por ser um gene com penetrância alta, quando mutado, gera um risco, durante toda a vida, de 60% a 85% para desenvolvimento de câncer de mama (WOOSTER; WEBER, 2003).

### 2.2.1 O gene *BRCA1* e o câncer esporádico de mama

Cerca de 90% dos tumores malignos da mama decorrem de mutações esporádicas, ou seja, que não foram herdadas dos pais. Nestes tumores, vários locos com genes supressores de tumor foram documentados com a presença de

LOH (KALIKIN *et al.*, 1996). É comum que genes alterados nas formas hereditárias de câncer também estejam alterados nos carcinomas não familiares (COX; CHEN; LEE, 1994). Entretanto, a participação do gene *BRCA1* no câncer esporádico de mama é tema controverso.

Futreal *et al.* (1994) avaliaram LOH do gene *BRCA1* em 72 casos de câncer de mama por intermédio dos marcadores D17S1323, D17S855 (intragênicos) e D17S1327 (localizado, aproximadamente, 100 kb distal ao gene *BRCA1*) e encontraram LOH em 36 casos (50%). Destes, 32 foram pesquisados para mutação no gene *BRCA1*. Porém, não observaram mutações somáticas. Encontraram, em três casos, mutações germinativas. Este resultado surpreendeu os autores que aventaram três explicações possíveis para justificar seu achado inesperado: falha na metodologia para identificação das mutações; as mutações esporádicas do gene *BRCA1* ocorreram nas sequências não codificadoras; e, finalmente, que a LOH no 17q não se traduziu na inativação do gene *BRCA1*, mas na de outros genes supressores nesta região.

Papa *et al.* (1998) encontraram um caso de mutação somática no éxon 2 do gene *BRCA1* em uma mulher de 32 anos, com carcinoma ductal infiltrante, em 96 casos de câncer de mama esporádico avaliados. Esta mulher morreu devido a metástases dois anos após o diagnóstico. Os pais e um irmão foram avaliados e não se observou a mutação em questão no gene *BRCA1* dos mesmos.

Van Der Looij *et al.* (2000) também encontraram um caso de mutação somática no gene *BRCA1* em 81 casos de câncer esporádico de mama avaliados. Para isso, utilizaram técnica de *Southern blotting* e cinco marcadores. Neste caso, a paciente com mutação tinha 70 anos de idade.

Janatova *et al.* (2005) avaliaram 40 pacientes com câncer esporádico de mama e observaram LOH no gene *BRCA1* em 21,1% de 38 tumores informativos. Destes, em apenas dois casos foram encontradas mutações somáticas no gene *BRCA1*. A LOH foi determinada por três marcadores intragênicos (D17S1322, D17S1323 e D17S855). As mutações ocorreram no éxon 11 e as pacientes tinham 60 e 51 anos de idade.

Em resumo, a presença de LOH não se traduziu em mutações no alelo selvagem do gene *BRCA1*, na maioria dos casos avaliados. Por outro lado, vários artigos demonstraram a presença de LOH ou alterações epigenéticas no gene *BRCA1* associadas à diminuição da expressão do mRNA do gene *BRCA1* ou da

proteína BRCA1 no câncer esporádico de mama. São apresentados, a seguir, em ordem cronológica, alguns desses artigos publicados e indexados na base de dados MEDLINE.

Nagai *et al.* (1994) analisaram LOH em um grupo de 100 tumores esporádicos de mama, com 10 marcadores polimórficos em 17q12-21. A perda alélica foi detectada em 40 dos 100 tumores, em ao menos um dos marcadores. A região que mais apresentou LOH foi a do gene *BRCA1* com 27 casos, sugerindo a associação deste aos tumores esporádicos de mama.

Cropp *et al.* (1994) analisaram o envolvimento da região 17q21 em 130 amostras de câncer esporádico de mama com 17 marcadores polimórficos, entre D17S250 (proximal ao gene *BRCA1*) e D17S579 (distal ao gene *BRCA1*) em relação à LOH. Este intervalo contém, aproximadamente, 3,5 mil kb. A frequência de LOH variou de 12% a 32% e foi maior entre os marcadores D17S846 e D17S746 (30% - 32%), distantes, aproximadamente, 120 kb entre si.

Thompson *et al.* (1995) avaliaram a expressão do gene *BRCA1* pela identificação dos níveis de mRNA em culturas de tecido mamário normal (quatro amostras), carcinoma intraductal (5 amostras) e carcinoma invasivo de mama (19 amostras). Observaram níveis 5 a 10 vezes menores de mRNA no carcinoma invasivo em relação ao carcinoma intraductal e tecido mamário normal. Também demonstraram que a inibição experimental da expressão do *BRCA1* com oligonucleotídeos *antisense* acelerou o crescimento tanto das células epiteliais normais da mama quanto das tumorais. Com isso, sugeriram o *BRCA1* como um regulador negativo da proliferação das células epiteliais da mama.

Rio *et al.* (1998) estudaram a LOH do gene *BRCA1* em 59 casos esporádicos de câncer de mama e observaram a presença de LOH em 31% dos casos informativos. Para isso, utilizaram três marcadores intragênicos (D17S1323, D17S1322 e D17S855). A presença de LOH foi relacionada a tumores de alto grau histológico ( $P = 0,005$ ) e à ausência de receptores hormonais ( $P = 0,01$ ).

Silva *et al.* (1999) avaliaram a LOH do gene *BRCA1* e *BRCA2* em 140 casos esporádicos de câncer de mama e observaram a presença de LOH no gene *BRCA1* em 40 (47%) de 85 casos informativos. Para análise do *BRCA1*, utilizaram quatro marcadores na região 17q21 (D17S856, D17S855, D17S1323 e D17S1327). A frequência de LOH foi estatisticamente maior nos tumores de alto grau, com presença de receptores hormonais (estrogênio e progesterona), invasão



angiolímfática e linfonodos axilares comprometidos. Entretanto, quando os casos não informativos e que também apresentavam LOH no gene *BRCA2* foram excluídos, não houve diferença estatística. Portanto, conseguiram demonstrar que os tumores mais agressivos apresentavam perda de LOH nos dois genes avaliados.

Seery *et al.* (1999, p. 258) avaliaram a expressão do mRNA dos genes *BRCA1* e *RE* (receptor de estrogênio) em 53 tumores malignos primários de mama. Com isso, queriam investigar a hipótese de que “a associação da diminuição da expressão destes abriria as vias para aceleração da proliferação das células tumorais.” Eles conseguiram estabelecer associação entre a expressão do mRNA do *BRCA1* e do *RE* ( $P = 0,013$ ), indicando uma possível relação funcional entre os dois genes. Por fim, demonstraram que baixos níveis de expressão do *BRCA1*, em 15 tumores (28,3%), estavam significativamente associados à presença de metástases à distância ( $P = 0,019$ ) em um intervalo menor de tempo ( $P = 0,015$ ), em relação aos casos com expressão normal do *BRCA1*.

Hanby *et al.* (2000) avaliaram a associação de LOH dos genes *BRCA1* e *BRCA2* com as características morfológicas de 120 tumores malignos de mama. Para isso, utilizaram quatro marcadores para cada gene. A frequência de LOH foi de 50% para o *BRCA1* e 54% para o *BRCA2*. Houve uma forte associação entre a LOH do *BRCA1* e do *BRCA2* ( $P < 0,001$ ). Também ocorreu associação significativa entre a LOH do gene *BRCA1* e maior número de mitoses e pleomorfismo nuclear.

Johnson, Shaw e Walker (2002) compararam a frequência de LOH do gene *BRCA1* entre pacientes jovens e idosas com câncer esporádico de mama. Foram avaliadas 31 pacientes com idade entre 26 e 35 anos e 31 pacientes com idade entre 55 e 72 anos. Houve uma diferença significativa para o marcador D17S855 que demonstrou LOH em 64,5% das pacientes jovens e em 35,5% das idosas ( $P < 0,025$ ). A presença de LOH ocorreu sem relação com o grau histológico.

Matros *et al.* (2005) avaliaram a hipermetilação da região promotora do gene *BRCA1* em 75 casos de câncer esporádico de mama. Esta foi observada em 16 casos (21%). Não houve associação entre a hipermetilação e achados clínicos ou patológicos. Não obstante, os tumores com hipermetilação apresentaram menor expressão da proteína *BRCA1* (17%) em relação aos tumores sem hipermetilação (32%).

Rakha *et al.* (2008, p. 864) avaliaram a expressão e localização da proteína *BRCA1* em 1,482 mil casos de câncer de mama esporádico. Observaram a ausência

da expressão nuclear da proteína BRCA1 em 223 casos (15%) e a redução da expressão em 578 casos (39%). A ausência ou redução da expressão da BRCA1 ocorreu principalmente nas pacientes com tumores maiores, de alto grau, com presença de invasão vascular, ausência de receptor hormonal e linfonodos axilares comprometidos. A presença da proteína BRCA1 no citoplasma foi mais frequente nos tumores com amplificação do *HER2* e resultou em maior número de recidivas da doença. Os tumores triplo-negativos apresentaram alteração na expressão nuclear da proteína BRCA1 em 80% dos casos. O intervalo livre de doença foi menor nas pacientes com a proteína BRCA1 diminuída ou ausente. Por outro lado, não houve diferença na sobrevida global entre os grupos com e sem expressão da proteína BRCA1. Mesmo assim, os autores concluíram que “alterações na BRCA1 em tumores malignos esporádicos de mama são mais importantes do que se concebia até então”.

### 2.3 GENE *FHIT*

Descrito em 1996, o gene *FHIT* (*fragile histidine triad*) está localizado na região 3p14.2. Possui 1,8 Mb e é composto por 10 éxons. Apenas a região compreendida entre os éxons 5 e 9 codifica um mRNA de 1,1 kb que é traduzido na proteína FHIT de 16,8 kDa (OHTA *et al.*, 1996).

A proteína FHIT é uma dinucleosídeo trifosfato hidrolase (Ap3A), com 147 aminoácidos, que atua no metabolismo da purina e como molécula sinalizadora envolvida na diferenciação e apoptose celular (BARNES *et al.*, 1996). Desde sua descoberta, o *FHIT* foi considerado um potencial gene supressor tumoral, envolvido na gênese de neoplasias de cabeça e pescoço, pulmão, esôfago, estômago, cólon, colo de útero e mama (HUEBNER; CROCE, 2003).

O gene *FHIT* contém no seu quinto íntron o *FRA3B*, considerado sítio frágil comum do genoma humano, local de quebras frequentes, rearranjos cromossômicos e perdas alélicas observadas em células neoplásicas (GLOVER; STEIN, 1988).

Huebner e Croce (2001) demonstraram que a perda de um alelo (*One hit model*) do gene *FHIT* foi suficiente para o surgimento de lesões pré-neoplásicas (metaplasia) e diminuição da expressão da proteína FHIT. Com isso, concluíram que

o gene *FHIT* não segue a teoria de Knudson e que sua alteração pode ocorrer nas fases iniciais da oncogênese

### 2.3.1 O gene *FHIT* e o câncer de mama

Alterações no gene *FHIT* no câncer de mama ocorreram na forma de LOH, hipermetilação, diminuição da expressão do mRNA e também foram demonstradas de forma indireta pela diminuição ou ausência da proteína FHIT. As mutações, assim como no gene *BRCA1*, foram raras.

Negrini *et al.* (1996) foram os primeiros a demonstrar que o gene *FHIT* estava alterado no câncer de mama. Pela análise de 11 linhagens de células derivadas de câncer humano de mama e 30 casos de carcinoma primário de mama, estes pesquisadores observaram falhas na transcrição do gene em 20% dos casos e ausência de expressão do mRNA em 10%.

Ahmadian *et al.* (1997) realizaram extração de DNA de tecido parafinado para avaliação da LOH do gene *FHIT* em epitélio mamário normal, hiperplásico, carcinoma intraductal e infiltrante. Esta ocorreu em 6 de 16 amostras de carcinoma invasivo de mama (37,5%), em três de seis amostras de carcinoma intraductal e em duas de oito amostras de hiperplasia. Por fim, não observaram LOH em seis amostras de tecido mamário normal. Também encontraram um caso de mutação germinativa em 32 amostras tumorais avaliadas. Com isso, demonstraram a precocidade da LOH do gene *FHIT* na oncogênese mamária e que a mutação do gene *FHIT* é um evento raro no câncer de mama.

Campiglio *et al.* (1999) foram pioneiros em relacionar a presença do gene *FHIT* inativo com um fenótipo mais agressivo de câncer de mama. Para isso, avaliaram duas séries. Uma com 29 casos de carcinoma mamário humano, em que foi avaliada a transcrição do gene *FHIT* e os níveis da proteína FHIT. Observaram que em nove casos (31%) a transcrição foi aberrante ou ausente e os níveis da FHIT estavam baixos ou nulos. Na outra série, com 156 casos, foi determinada a expressão da proteína FHIT que estava diminuída ou ausente em um terço dos casos. Nas duas séries, as amostras com níveis baixos ou nulos de expressão da proteína FHIT foram de tumores maiores e pouco diferenciados.

Huiping *et al.* (2000) analisaram a LOH do gene *FHIT* em 49 casos de câncer lobular de mama, com cinco marcadores microssatélites. Encontraram LOH em 8 casos (16%) e expressão diminuída ou ausente da proteína FHIT em 15 (27%). Também compararam a frequência de LOH entre os tipos histológicos lobular e ductal, sendo que o carcinoma lobular apresentou menor frequência ( $P < 0,001$ ).

Até então, o gene *FHIT* era considerado um supressor tumoral em potencial, com base em estudos realizados em ratos (HUEBNER *et al.*, 1998).

Gatalica *et al.* (2000, p. 1378) ratificaram a função do gene *FHIT* como supressor tumoral no câncer de mama, baseados na premissa de que “a perda de expressão de um gene supressor tumoral é um passo importante na progressão tumoral de lesão pré-maligna para *in situ* e, finalmente, para carcinoma invasivo.” Eles avaliaram a expressão da proteína FHIT por imuno-histoquímica em amostras de tecido de 50 peças provenientes de mastectomia. Nestas amostras estavam representadas lesões epiteliais dos vários estágios de progressão tumoral até o carcinoma invasivo. Observaram redução ou ausência de expressão da proteína FHIT em 54% dos carcinomas infiltrativos e uma relação inversa entre a progressão tumoral e a expressão da FHIT, ou seja, a expressão diminuiu conforme se evoluiu de epitélio normal para hiperplasia, hiperplasia atípica, carcinoma *in situ* e carcinoma invasor. Por outro lado, os autores não observaram diminuição da FHIT nas lesões pré-neoplásicas quando o carcinoma invasivo expressava a proteína FHIT.

Zöchbauer-Müller *et al.* (2001) investigaram a LOH e a metilação do gene *FHIT* (região 5' CpG) no câncer de mama. A metilação ocorreu em 12 (31%) de 39 casos avaliados e a LOH ocorreu em 12 (50%) de 24 casos informativos. Houve concomitância de LOH e metilação em 48% dos casos. Não houve relação entre a metilação e outros parâmetros clínicos e patológicos avaliados. Entretanto, houve relação entre a metilação e diminuição tanto do mRNA quanto da expressão da proteína FHIT.

Ingvarsson *et al.* (2001) estudaram a relação da LOH do gene *FHIT* com as características clínicas e sobrevida em 239 pacientes com câncer de mama. A presença de LOH foi determinada por meio de cinco marcadores intragênicos. Também foi determinada a expressão da proteína FHIT por método de imuno-histoquímica em 138 pacientes. A LOH do gene *FHIT* ocorreu em 66 pacientes (32%). Nestes pacientes também ocorreu diminuição da expressão da proteína FHIT ( $P < 0,001$ ). Houve associação estatisticamente significativa entre a LOH do gene

*FHIT* e receptor hormonal negativo, assim como fração alta de células em fase S. A sobrevida foi menor no grupo de pacientes com LOH do gene *FHIT* em relação às pacientes sem LOH em cinco anos de seguimento ( $P = 0,008$ ). Em análise multivariada, a LOH do gene *FHIT* foi considerada um fator prognóstico independente de sobrevida ( $P = 0,045$ ).

Em dezembro deste mesmo ano, Yang *et al.* (2001) reforçaram os achados de Ingvarsson *et al.* (2001) ao relacionarem a expressão da proteína FHIT com parâmetros clínicos e patológicos de 166 pacientes com câncer de mama. Pela técnica de imuno-histoquímica, os autores demonstraram que a proteína FHIT estava ausente ou diminuída em 70 casos (42,2%). Quanto mais baixa a expressão da FHIT, maior a frequência de tumores grau 3, com ausência de receptor estrogênico, superexpressão de p53 e maior atividade proliferativa. Por outro lado, em análise multivariada, não foi demonstrada piora na sobrevida para o grupo com LOH ( $P > 0,05$ ).

Ginestier *et al.* (2003) avaliaram a expressão da proteína FHIT em 452 casos de câncer de mama, divididos em dois grupos. O grupo I, com 153 pacientes de bom prognóstico, com axila livre de doença e sem indicação para tratamento com quimioterapia adjuvante, segundo os critérios de consenso da conferência de *St. Gallen*; o grupo II, com 226 pacientes de alto risco e com indicação para tratamento com quimioterapia. O seguimento médio foi de 48 meses. Os autores demonstraram que, no grupo I, a expressão da FHIT esteve significativamente associada à sobrevida livre de doença. Portanto, foi um fator prognóstico independente neste grupo de pacientes. O mesmo não ocorreu no grupo II.

Arun *et al.* (2005) demonstraram a ausência de expressão da proteína FHIT em 35 (44%) de 80 casos de câncer de mama pela análise imuno-histoquímica. Neste estudo, não houve relação entre a expressão da FHIT e da ciclo-oxigenase 2 (COX2), um marcador de mau prognóstico no câncer de mama.

Guler *et al.* (2009) avaliaram a expressão das proteínas FHIT e WWOX (técnica de imuno-histoquímica) em 837 amostras de câncer de mama previamente fixadas e emblocadas em parafina. Destas, 89 eram de câncer de mama tipo basal-símile. Eles observaram que a diminuição ou ausência das proteínas FHIT e WWOX foi mais frequente no grupo de tumores basal-símile em relação ao restante da amostra. Essa diferença foi estatisticamente significativa ( $P < 0,001$ ), sugerindo a

atuação tanto da proteína FHIT quanto da WWOX na patogênese dos tumores malignos de mama tipo basal-símile.

#### 2.4 RELAÇÃO ENTRE OS GENES *BRCA1* E *FHIT*

Conforme já descrito neste estudo, os genes *BRCA1* e *FHIT* são considerados supressores tumorais. Sabe-se que a inativação do gene *BRCA1*, assim como a do gene *FHIT*, ocorre nas fases iniciais da gênese tumoral mamária e gera instabilidade cromossômica, permitindo novas mutações do DNA. Ingvarsson *et al.* (2001) demonstraram associação, estatisticamente significativa, entre a LOH do gene *FHIT* e da região 17q. Apenas dois artigos originais, em pesquisa nas fontes LILACS, IBECs, MEDLINE, Biblioteca Cochrane e SciELO, em julho de 2009, avaliaram alterações concomitantes nos genes *BRCA1* e *FHIT* no câncer de mama. Estes dois artigos são apresentados a seguir.

Turner *et al.* (2002) avaliaram a relação entre a mutação do gene *BRCA1* e a expressão da proteína FHIT em 22 casos de câncer familiar de mama, com o gene *BRCA1* sabidamente mutado. Estes casos foram comparados com 22 casos-controle, em que o gene *BRCA1* estava comprovadamente íntegro. Apenas dois (9%) dos carcinomas de mama com mutações no gene *BRCA1* expressaram a proteína FHIT. No grupo controle, 15 (68%) amostras expressaram a proteína FHIT ( $P < 0,001$ ), sugerindo que o gene *BRCA1* seja importante para a manutenção do sítio frágil comum *FRA3B* e do gene *FHIT*.

Santos *et al.* (2004) analisaram 34 casos de câncer esporádico de mama em relação à LOH dos genes *BRCA1* e *FHIT*. Para isso, utilizaram quatro marcadores para o gene *BRCA1* e um marcador para o *FHIT*. A LOH no gene *BRCA1* ocorreu em 42%, e no gene *FHIT*, em 24% dos casos. Em quatro dos seis casos em que ocorreu LOH do *FHIT*, o gene *BRCA1* também apresentou LOH. Este achado reforçou a possibilidade de que a LOH do gene *BRCA1* provoque instabilidade cromossômica e resulte em desequilíbrio alélico em outros locos, como o do gene *FHIT*.

### 3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

As 82 pacientes, do sexo feminino, com câncer esporádico de mama, que participaram até a fase final deste estudo longitudinal, foram selecionadas durante o ano de 2003 no serviço de Mastologia da União Oeste Paranaense de Estudos e Combate ao Câncer (UOPECCAN), uma instituição de referência em tratamento do câncer na região oeste do Paraná. A purificação e análise do DNA foram realizadas no laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

#### 3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

No momento da seleção, foram incluídas as pacientes que preencheram as condições descritas a seguir:

- a) portadoras de carcinoma infiltrativo de mama, comprovado por exame histológico;
- b) ausência de outras neoplasias malignas, exceto câncer de pele não melanoma;
- c) ausência de metástases à distância nos exames de estadiamento inicial;
- d) ausência de casos de câncer de mama em parentes de primeiro grau (pai, mãe, irmãos e filhos);
- e) ausência de tratamento com quimioterapia, radioterapia ou hormonioterapia anterior à cirurgia para o câncer de mama.

Nesta fase, foram selecionadas 144 pacientes.

### 3.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram consideradas critérios de exclusão as seguintes situações observadas no transcorrer da pesquisa:

- a) não realização das etapas de quimioterapia e radioterapia, relativas ao tratamento para o câncer de mama, quando indicadas (quatro pacientes);
- b) interrupção do tratamento hormonal antes do tempo proposto (uma paciente);
- c) perda do seguimento oncológico no decorrer dos anos (três pacientes);
- d) ausência de tecido normal no bloco de parafina (15 pacientes);
- e) qualidade inadequada do DNA para análise da LOH (39 pacientes).

A amostra final para análise da LOH dos genes *BRCA1* e *FHIT* foi constituída por 82 pacientes.

### 3.3 ASPECTOS ÉTICOS

Foram cumpridos os termos das normas vigentes para pesquisas em seres humanos, conforme Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE; CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE, 1996).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR (ANEXO).



## 3.4 TRATAMENTO

### 3.4.1 Cirurgia

Todas as pacientes do estudo foram tratadas com mastectomia radical modificada ou cirurgia conservadora da mama (quadrantectomia ou setorectomia), com ressecção dos linfonodos axilares.

### 3.4.2 Quimioterapia

Das 82 pacientes, 72 receberam tratamento sistêmico com quimioterapia. Este não foi realizado em 10 pacientes, de baixo risco, segundo os critérios de *St. Gallen* (GOLDHIRSCH *et al.*, 1998). Os regimes de quimioterapia adjuvante foram: AC (adriplastina + ciclofosfamida), FAC (fluorouracil + adriplastina + ciclofosfamida) e CMF (ciclofosfamida + metotrexate + fluorouracil). Detalhes dos regimes de quimioterapia e o tratamento individualizado de cada paciente estão descritos nos APÊNDICES 1 e 3, respectivamente.

### 3.4.3 Radioterapia

Todas as pacientes que foram submetidas a tratamento cirúrgico conservador da mama receberam radioterapia na mama remanescente (43 casos). As que preencheram os critérios para irradiação do plastrão, após mastectomia radical modificada, também foram irradiadas (29 pacientes). Os critérios foram: tumores maiores que 50 mm, invasão de pele e 4 ou mais linfonodos positivos na axila. O tratamento foi realizado conforme descrito a seguir:

- a) cirurgia conservadora da mama: radioterapia na mama com 5,04 mil cGy e mil cGy de *boost* na região de excisão do tumor;

- b) pós-mastectomia: radioterapia com 5,04 mil cGy no plastrão e linfonodos supraclaviculares, se indicado.

#### 3.4.4 Hormonioterapia

O medicamento utilizado para o tratamento hormonal foi o tamoxifeno (20 mg/dia), por cinco anos. Foram submetidas a tratamento as 53 pacientes da casuística com receptor hormonal positivo, três com receptor hormonal desconhecido e uma com receptor hormonal negativo. Em uma paciente, substituiu-se o tamoxifeno pelo anastrozol, em razão de trombose venosa profunda da panturrilha no primeiro ano de tratamento. Ao término do seguimento, 26 pacientes estavam em tratamento hormonal.

### 3.5 SEGUIMENTO

O tempo médio de seguimento foi de  $48 \pm 14,6$  meses e variou de 10 a 72 meses, incluindo as pacientes que foram a óbito. O tempo de seguimento iniciou na data da cirurgia para o câncer de mama e terminou na data do óbito ou em dezembro de 2007.

As pacientes foram seguidas por meio de revisão das anotações nos prontuários, realizada ao final de cada ano, de 2003 a 2007. Em geral, as pacientes foram acompanhadas com consultas a cada três meses no primeiro ano após o diagnóstico, de seis em seis meses até o terceiro ano e anualmente a seguir. Como regra, para as pacientes submetidas à cirurgia conservadora de mama, solicitou-se mamografia bilateral após seis meses da cirurgia e, a partir daí, anualmente. Para as pacientes submetidas à mastectomia radical modificada, foi solicitada mamografia da mama oposta anualmente. Outros exames foram realizados conforme queixas individuais.

## 3.6 DETERMINAÇÃO DAS VARIÁVEIS

### 3.6.1 Tamanho do tumor

O tamanho do tumor foi determinado por suas dimensões (maior diâmetro) no corte histológico. Eventual componente *in situ* no tecido mamário circunjacente não foi considerado. Os tumores foram agrupados em  $\leq 20$  mm e  $> 20$  mm.

### 3.6.2 Graduação histológica

Foi utilizado o sistema combinado de Nottingham, de Bloom e Richardson e modificado por Elston e Ellis, que considerou a presença de formação tubular, pleomorfismo nuclear e contagem mitótica (ELSTON; ELLIS, 1991). Os tumores foram classificados em graus 1 (bem diferenciados), 2 (moderadamente diferenciados) ou 3 (pouco diferenciados).

### 3.6.3 Invasão angiolinfática

Foi considerada invasão vascular a presença de êmbolos de células tumorais a pelo menos um campo microscópico de grande aumento da borda do tumor (ROSEN, 1983).

### 3.6.4 *Status* axilar

Os linfonodos axilares foram incluídos inteiros em parafina e corados com hematoxilina e eosina (HE) para exame histológico convencional. As pacientes foram

agrupadas da seguinte forma: com axila comprometida (ou positiva), quando se detectou a presença de metástases nos linfonodos, e com axila livre de metástases (ou negativa) quando não se encontraram células neoplásicas nos linfonodos avaliados.

### 3.6.5. Receptor hormonal

Foram determinadas as presenças de receptor de estrogênio (RE) e progesterona (RP) pela técnica de imuno-histoquímica. A presença ou ausência dos receptores foi considerada conforme metodologia proposta por Harvey *et al.* (1999). As pacientes que apresentaram pelo menos um receptor hormonal positivo (RE ou RP) foram consideradas como RH presente.

### 3.6.6 Superexpressão da proteína HER2

Esta variável foi determinada pela técnica de imuno-histoquímica e avaliação dos níveis de expressão da proteína HER2 na membrana celular. Os casos com *scores* 0 e 1 foram considerados negativos. Os casos com *score* 3 foram considerados positivos. Os casos com *score* 2 foram submetidos à realização do método de hibridização *in situ*, marcada por fluorescência (FISH). Os tumores com taxa de 2 ou mais no teste de FISH foram considerados positivos.

## 3.7 OBTENÇÃO E EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA para análise de LOH foi obtido em tecido normal e neoplásico previamente fixado em formalina 5% e parafinado. Com auxílio da análise microscópica de lâminas com o tecido corado em HE, realizou-se a macrodissecção das amostras nos blocos de parafina, conforme demonstrada na FOTOGRAFIA 1.



FOTOGRAFIA 1 – IDENTIFICAÇÃO DAS ÁREAS DE TUMOR (T) E NÃO TUMOR (NT) NO BLOCO DE PARAFINA

FONTE: O autor (2009)

Após uma série de testes e ajustes, o protocolo de extração de DNA por fenol-clorofórmio das amostras teciduais foi estabelecido conforme descrito a seguir:

- a) adicionar 1200  $\mu$ l de xilol no tubo com as amostras dilaceradas e agitar vigorosamente;
- b) centrifugar em velocidade máxima por cinco minutos em temperatura ambiente;
- c) remover o sobrenadante;
- d) adicionar 1200  $\mu$ l de etanol absoluto ao *pellet* e agitar suavemente;
- e) remover o sobrenadante;
- f) encubar o tubo aberto a 37 °C por alguns minutos, até que todo o etanol evapore;
- g) ressuspender o pellet em 260  $\mu$ l de tampão de proteinase K;
- h) adicionar 30  $\mu$ l de SDS estoque ao tubo;

- i) adicionar 10 µl de proteinase K ao tubo e incubar a 50 °C até que o tecido esteja totalmente digerido ou por quatro dias. Neste período, adicionar 10 µl de proteinase K (solução estoque) a cada 24 horas de intervalo de digestão;
- j) aquecer as amostras a 95 °C por 10 minutos para inativar a proteinase K;
- k) deixar as amostras à temperatura ambiente e adicionar 0,005 volumes de Rnase estoque (20 µg/µl). Incubar a 37 °C por 90 minutos;
- l) adicionar 1 volume de fenol:clorofórmio:isoamil 25:24:1, agitar por 15 segundos e centrifugar a 14 mil rpm por 5 minutos;
- m) transferir a camada de cima para um novo tubo e repetir o passo anterior;
- n) transferir a camada de cima para um novo tubo e adicionar 0,2 volumes de acetato de amônio 10 M;
- o) adicionar 0,02 volumes de glicogênio (20 µg/µl). Este passo é opcional;
- p) adicionar 2 volumes de etanol absoluto a 4 °C e inverter suavemente a posição do tubo diversas vezes;
- q) colocar o tubo em freezer a menos 20 °C por 12 horas;
- r) centrifugar o tubo a 14 mil rpm por 15 minutos e remover o sobrenadante;
- s) lavar o *pellet* com 1 ml de etanol a 70%;
- t) centrifugar o tubo a 14 mil rpm por 5 minutos e remover o sobrenadante;
- u) ressuspender o *pellet* em 50 µl de água deionizada e estocar a 4 °C. Hidratar por 48 horas.

O DNA extraído foi diluído em uma concentração de 20 ng/µl para amplificação por PCR (*polymerase chain reaction*) e análise da LOH.

### 3.8 AMPLIFICAÇÃO DO DNA POR PCR

A amplificação dos seis marcadores de microssatélites com repetição de dinucleotídeos selecionados foi realizada por meio da reação em cadeia da

polimerase (PCR). Para o loco 17q21 foram utilizados os marcadores D17S791 (telomérico ao gene *BRCA1*), D17S1322 e D17S1323 (intragênicos). Para o gene *FHIT* (loco 3p14.2), os marcadores intragênicos D3S1300, D3S4103 e D3S1234 foram escolhidos. Esta escolha foi baseada na alta taxa de heterozigose já relatada para estes marcadores e as sequências foram selecionadas no *Genome Database* (QUADRO 1).

Marcador	Sequência de nucleotídeos
D3S1300	
<i>Primer forward</i>	AGCTCACATTCTAGTCAGCCT
<i>Primer reverse</i>	GCCAATTCCCCAGATC
D3S4103	
<i>Primer forward</i>	TTCTACTGCAATCCAGCCTGG
<i>Primer reverse</i>	GCCTTGGGTAGATTTATACCT
D3S1234	
<i>Primer forward</i>	CCTGTGAGACAAAGCAAGAC
<i>Primer reverse</i>	GACATTAGGCACAGGGCTAA
D17S791	
<i>Primer forward</i>	GTTTTCTCCAGTTATTCCCC
<i>Primer reverse</i>	GCTCGTCCTTTGGAAGAGTT
D17S1322	
<i>Primer forward</i>	CTAGCCTGGGCAACAAACGA
<i>Primer reverse</i>	GCAGGAAGCAGGAATGGAAC
D17S1323	
<i>Primer forward</i>	TAGGAGATGGATTATTGGTG
<i>Primer reverse</i>	AAGCAACTTTGCAATGAGTG

QUADRO 1 – DESCRIÇÃO DOS SEIS MARCADORES DE MICROSSATÉLITES  
 FONTE: *Genome Database* (2009)

Os nucleotídeos iniciais (*primers*) foram marcados com um dos corantes fluorescentes, HEX (amarelo) ou 6-FAM (azul) (*Applied Biosystem/PE Biosystems, Foster City, CA, USA*). Em todos os casos os marcadores foram inicialmente avaliados no tecido normal. Após, os informativos foram aplicados no tecido tumoral. A amplificação do DNA por PCR foi realizada conforme protocolo descrito no QUADRO 2 (SANTOS *et al.*, 2004).

A amplificação consistiu em uma desnaturação inicial por 5 minutos a 96 °C, seguidos por 30 ciclos a 96 °C por 1 minuto para continuação da desnaturação, 1 minuto a 55 °C para anelamento dos iniciadores e 1 minuto a 72 °C, seguido de 20 minutos também a 72 °C para amplificação das regiões alvo. Utilizou-se, para tanto, um termociclador MJ Research PTC 200.

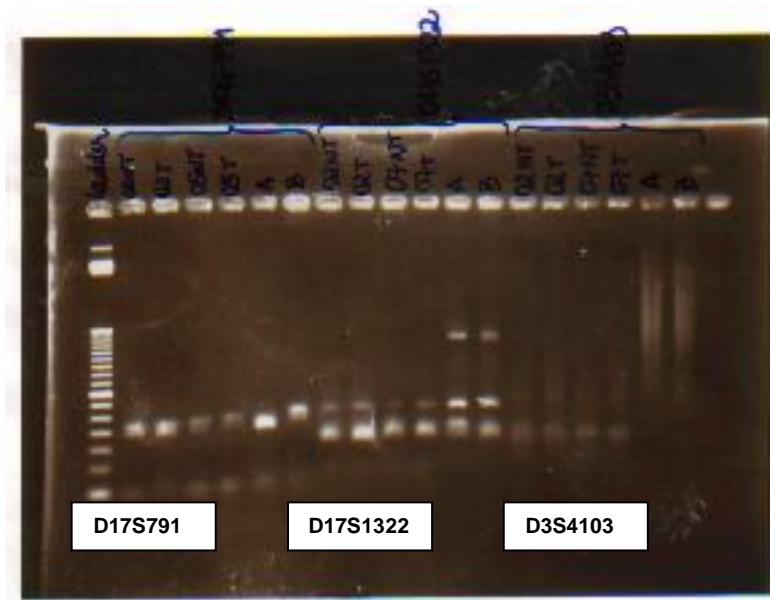
Reagente	Concentração Estoque	Concentração Final	Volume na reação
DNA	Variável	20 ng/μl	1,0 μl
Tampão	10 X	1 X	1,0 μl
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2,5 mM	0,5 μl
dNTP	2 mM	200 μM	1,0 μl
<i>Primer forward</i>	20 μM	8 μM	0,6 μl
<i>Primer reverse</i>	20 μM	8 μM	0,6 μl
<i>Taq</i> DNA polimerase	5 U/μl	1,0 U/μl	0,1 μl
H <sub>2</sub> O ultrapura			5,2 μl
TOTAL			10 μl

QUADRO 2 – COMPOSIÇÃO DA MISTURA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

FONTE: Santos *et al.* (2004)

3.8.1 Análise dos produtos da PCR

Os produtos da PCR foram analisados primeiramente em gel de poliacrilamida 4,25% para certificação da amplificação do DNA conforme demonstrada na FOTOGRAFIA 2.



FOTOGRAFIA 2 – EXEMPLO DE AMPLIFICAÇÃO DO DNA EM GEL POLIACRILAMIDA 4,25% PARA OS MARCADORES DOS GENES *BRCA1* E *FHIT*

FONTE: O autor (2009)



Os dados relativos aos tamanhos dos alelos foram comparados com um tamanho padrão ET-ROX 400 (*Amershan Biosciences*) com um sequenciador automático (MegaBACE 1000). Os sinais fluorescentes dos alelos com diferentes tamanhos foram arquivados e analisados pelo programa *Fragment Profiler*, versão 2.1 (*Amershan Biosciences*).

### 3.9 ANÁLISE DA PERDA DE HETEROZIGOSE

Esta etapa do trabalho foi realizada no laboratório de citogenética da UFPR por técnicos que desconheciam a evolução clínica das pacientes.

A LOH foi demonstrada pela diferença de tamanho ou ausência de um dos alelos no tecido tumoral em relação ao DNA normal. As amostras cujos marcadores eram homocigotos na análise do tecido normal foram consideradas não informativas. A LOH, visualizada na figura criada pelo MegaBACE 1000 (FIGURA 1), foi determinada para cada marcador informativo por meio da seguinte fórmula, semelhante à proposta por Cawkwell *et al.* (1993):

$$\text{LOH} = \frac{\frac{\text{Altura do pico do alelo normal 2}}{\text{Altura do pico do alelo normal 1}}}{\frac{\text{Altura do pico do alelo tumoral 2}}{\text{Altura do pico do alelo tumoral 1}}}$$

O alelo 1 é o que possui menor tamanho em pares de base e o alelo 2 é o que possui maior tamanho em pares de base. Um valor de  $\text{LOH} \leq 0,5$  indica que a amostra tumoral apresenta perda significativa do alelo de menor tamanho. Por outro lado, um valor de  $\text{LOH} \geq 1,5$  indica que a amostra tumoral apresenta perda do alelo maior.

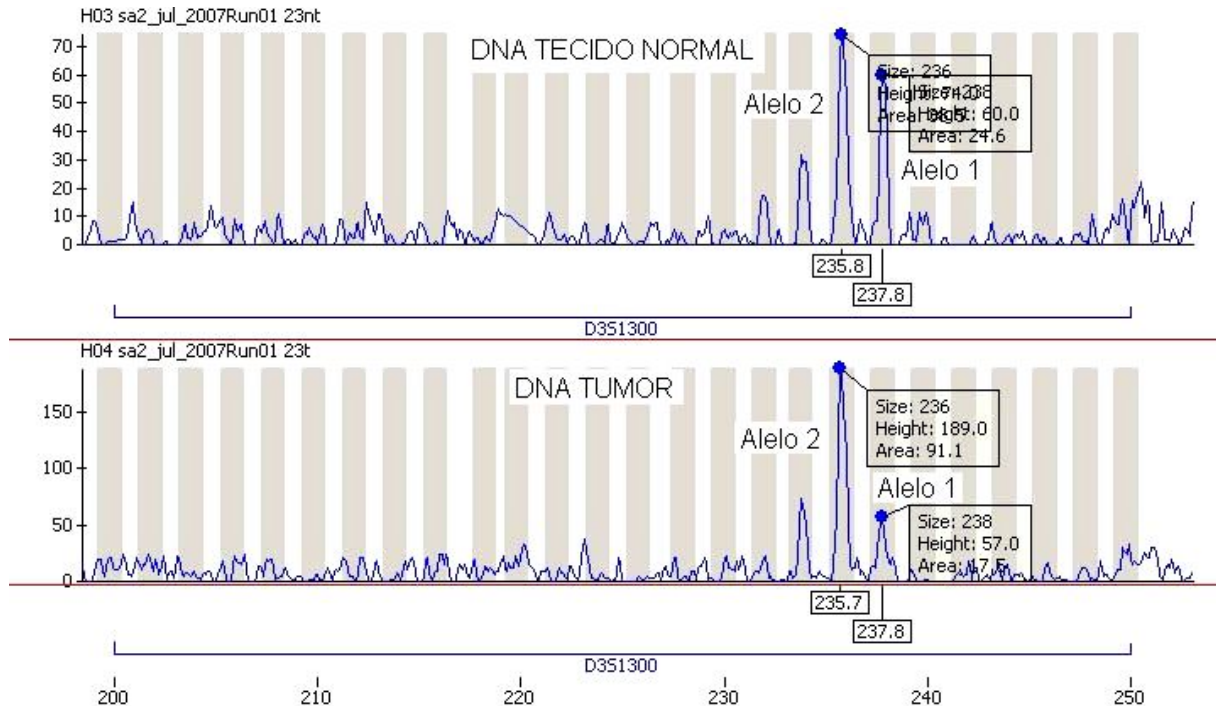


FIGURA 1 – EXEMPLO DE LOH DO GENE *FHIT* NO TECIDO TUMORAL (ALELO 1) COM O MARCADOR D3S1300

FONTE: O autor (2009)

### 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) foi utilizado para determinar se a frequência de LOH foi igualmente distribuída entre os marcadores e os genes *BRCA1* e *FHIT*. Para avaliar a relação da LOH com as demais variáveis (idade, tamanho tumoral, grau histológico, *status* axilar, invasão angiolinfática peritumoral, receptor hormonal e superexpressão da HER2) foi utilizado o teste exato de Fisher. Para sobrevida, foram utilizados os testes LOG-rank para análise univariada, COX: Modelo de Risco Proporcional para análise multivariada e a curva de sobrevida de Kaplan-Meier. Valor de  $P < 0,05$  foi considerado significativo. O tratamento dos dados estatísticos foi realizado com apoio do programa estatístico BioEstat<sup>®</sup> 5.0.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERÍSTICAS DAS PACIENTES

A idade média das pacientes, no momento do diagnóstico, foi  $51,8 \pm 14,3$  anos, variando de 25 a 85 anos. O tipo histológico ductal infiltrante ocorreu em 75 pacientes (91,4%). Os tipos histológicos lobular e papilífero ocorreram em dois casos cada (2,4%). Os tipos histológicos cribriforme, medular e mucinoso ocorreram em um caso cada (1,2%). As demais características clínicas e procedimentos terapêuticos nas 82 pacientes estão demonstrados na TABELA 1 e APÊNDICES 2 e 3.

TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DO TRATAMENTO

<b>Característica</b>	<b>Número de pacientes (%)</b>
<b>Idade</b>	
< 50 anos	42 (51,2)
≥ 50 anos	40 (48,8)
<b>Tamanho do tumor</b>	
≤ 20 mm	20 (24,4)
> 20 mm	62 (75,6)
<b>Linfonodos axilares</b>	
Com metástases	37 (45,1)
Livres	45 (54,9)
<b>Grau histológico</b>	
1 (bem diferenciado)	21 (25,6)
2 (moderadamente diferenciado)	27 (32,9)
3 (pouco diferenciado)	34 (41,5)
<b>Invasão angiolímfática</b>	
Presente	51 (62,2)
Ausente	31 (37,8)
<b>Receptor hormonal</b>	
Presente (E ou P ou E+P)	53 (64,5)
Ausente (E e P)	25 (30,5)
Não determinado	4 (5)
<b>Superexpressão HER2</b>	
Presente	13 (15,8)
Ausente	61 (74,4)
Não determinado	8 (9,8)
<b>Cirurgia</b>	
Mastectomia	39 (47,5)
Cirurgia conservadora	43 (52,5)
<b>Quimioterapia</b>	
Sim (AC, CMF, FAC)	72 (87)
Não	10 (13)
<b>Radioterapia</b>	
Sim	72 (87)
Não	10 (13)
<b>Tratamento hormonal</b>	
Sim (TMX, IA)	57 (69,5)
Não	25 (30,5)

FONTE: O autor (2009)

NOTA: E = estrogênio; P = progesterona; AC = adriplastina + ciclofosfamida; CMF = ciclofosfamida + metotrexate + fluorouracil; FAC = fluorouracil + adriplastina + ciclofosfamida; TMX = tamoxifeno; IA = inibidor da aromatase; HER2 = *Human epidermal growth factor receptor-type 2*

## 4.2 FREQUÊNCIA DE LOH NOS GENES *BRCA1* E *FHIT*

A perda da heterozigose foi determinada com base em seis marcadores (três no loco 3p14.2 – gene *FHIT* – e três no loco 17q21 – gene *BRCA1*). Das 82 pacientes, 72 foram informativas para os dois locos. As frequências de LOH para cada loco estão demonstradas na TABELA 2. Portanto, as 10 pacientes não informativas (homozigotas para um dos locos) foram excluídas das análises de resultados.

TABELA 2 – FREQUÊNCIA DE LOH PARA OS MARCADORES

<b>Marcador</b>	<b>Pacientes heterozigotas</b>	<b>Presença de LOH (%)</b>
D3S1300 ( <i>FHIT</i> )	60	19 (31,7)
D3S4103 ( <i>FHIT</i> )	59	12 (20,3)
D3S1234 ( <i>FHIT</i> )	54	19 (35,1)
D17S791 ( <i>BRCA1</i> )	64	22 (34,4)
D17S1323 ( <i>BRCA1</i> )	43	16 (37,2)
D17S1322 ( <i>BRCA1</i> )	48	18 (37,5)

FONTE: O autor (2009)

Entre os casos informativos, a frequência de LOH foi maior que 20% em todos os marcadores, com variação de 20,3% (D3S4103) a 37,5% (D17S1322). Estas frequências foram igualmente distribuídas entre todos os marcadores ( $\chi^2_5 = 5,27$ ;  $P > 0,30$ ). A presença de LOH nos genes *BRCA1* e *FHIT*, considerando todos os marcadores, foi alta, conforme demonstrada na TABELA 3.

TABELA 3 – FREQUÊNCIA DE LOH PARA OS GENES *BRCA1* E *FHIT*

<b>Gene</b>	<b>Pacientes heterozigotas</b>	<b>Presença de LOH (%)</b>
<i>FHIT</i>	80	38 (47,5)
<i>BRCA1</i>	74	38 (51,4)

FONTE: O autor (2009)

Estas frequências também foram igualmente distribuídas entre os genes ( $\chi^2_1 = 0,23$ ;  $P > 0,50$ ).

A presença ou ausência de LOH nos genes *BRCA1* e *FHIT* determinou a formação de quatro grupos de pacientes, descritos a seguir:

- a) grupo AA: ausência de LOH nos genes *BRCA1* e *FHIT*;
- b) grupo PP: presença de LOH nos genes *BRCA1* e *FHIT*;
- c) grupo A<sub>B</sub>P<sub>F</sub>: ausência de LOH no gene *BRCA1* e presença de LOH no gene *FHIT*;
- d) grupo P<sub>B</sub>A<sub>F</sub>: presença de LOH no gene *BRCA1* e ausência de LOH no gene *FHIT*.

A frequência dessas combinações ocorreu conforme demonstrada na TABELA 4.

TABELA 4 – AGRUPAMENTO DAS 72 PACIENTES INFORMATIVAS EM RELAÇÃO À LOH NOS GENES *BRCA1* E *FHIT*

Grupo	Número de pacientes (%)
AA (sem LOH)	23 (32)
PP (LOH concomitante)	24 (33,3)
A <sub>B</sub> P <sub>F</sub> (LOH no gene <i>FHIT</i> )	11 (15,2)
P <sub>B</sub> A <sub>F</sub> (LOH no gene <i>BRCA1</i> )	14 (19,4)

FONTE: O autor (2009)

#### 4.3 RELAÇÃO DA LOH COM AS DEMAIS VARIÁVEIS

A presença e ausência de LOH nos genes *BRCA1* e *FHIT* foi relacionada com as demais variáveis (idade, tamanho do tumor, grau histológico, presença de invasão angiolinfática, *status* axilar, presença de receptor hormonal e superexpressão da HER2) das 72 pacientes informativas. Para isto, as pacientes com LOH em um gene e ausência no outro foram consideradas em conjunto como grupo AP+PA. Estas comparações estão demonstradas nas TABELAS 5 e 6.

TABELA 5 – RELAÇÃO ENTRE A LOH CONCOMITANTE E AS DEMAIS VARIÁVEIS

Variável	LOH concomitante N° pacientes (%)	Ausência de LOH N° pacientes (%)	Valor de P*
Idade			0,14
< 50 anos	14 (58,3)	8 (34,8)	
≥ 50 anos	10 (41,6)	15 (65,2)	
Tamanho do tumor			0,004
≤ 20 mm	1 (4,1)	9 (39,1)	
> 20 mm	23 (95,8)	14 (60,9)	
Grau histológico			0,001†
1	2 (8,3)	10 (43,4)	
2	7 (29,1)	9 (39,1)	
3	15 (62,5)	4 (17,3)	
Status axilar			0,01
Positiva	14 (58,3)	5 (21,7)	
Negativa	10 (41,6)	18 (78,3)	
IAL			0,01
Presente	18 (75)	9 (39,1)	
Ausente	6 (25)	14 (60,9)	
Receptor hormonal‡			0,023
Presente	12 (52,1)	19 (86,4)	
Ausente	11 (47,8)	3 (13,6)	
Superexpressão HER2‡			0,11
Presente	4 (17,3)	0 (0)	
Ausente	19 (82,6)	19 (100)	

FONTE: O autor (2009)

NOTA: \*O valor de P foi calculado pelo teste exato de Fisher.

†O valor de P foi obtido pela comparação do grau histológico 1 com o 3.

‡O N excluiu os casos ND (não determinados).

IAL = invasão angiolinfática; HER2 = *Human epidermal growth factor receptor-type 2*.

As informações da TABELA 5 indicam que os valores de P foram estatisticamente significantes em cinco (tamanho do tumor, grau histológico, status axilar, IAL e receptor hormonal) das sete variáveis, demonstrando que nestas variáveis as frequências observadas não se distribuíram igualmente nos dois grupos de pacientes. Os indicadores de pior prognóstico (tamanho do tumor > 20 mm, grau histológico 3, axila positiva, presença de IAL e ausência de receptor hormonal) foram mais frequentes nas pacientes com perda de heterozigose em ambos os genes. Por outro lado, não houve diferença estatisticamente significativa entre as frequências observadas em ambos os grupos com relação à idade e superexpressão da HER2.

A perda da heterozigose em apenas um gene (*BRCA1* ou *FHIT*) também foi comparada com as demais variáveis, conforme demonstrada na TABELA 6.

TABELA 6 – RELAÇÃO ENTRE A LOH EM APENAS UM GENE E AS DEMAIS VARIÁVEIS

Variável	LOH isolada ( <i>BRC1</i> ou <i>FHIT</i> ) N° pacientes (%)	Ausência de LOH N° pacientes (%)	Valor de P*
Idade			0,25
< 50 anos	13 (52)	8 (34,8)	
≥ 50 anos	12 (48)	15 (65,2)	
Tamanho do tumor			0,76
≤ 20 mm	8 (32)	9 (39,1)	
> 20 mm	17 (68)	14 (60,9)	
Grau histológico			0,06†
1	5 (20)	10 (43,4)	
2	9 (36)	9 (39,1)	
3	11 (44)	4 (17,3)	
Status axilar			0,07
Positiva	12 (48)	5 (21,7)	
Negativa	13 (52)	18 (78,3)	
IAL			0,04
Presente	18 (72)	9 (39,1)	
Ausente	7 (28)	14 (60,9)	
Receptor hormonal‡			0,28
Presente	16 (69,5)	19 (86,4)	
Ausente	7 (30,4)	3 (13,6)	
Superexpressão HER2‡			0,01
Presente	7 (30,4)	0 (0)	
Ausente	16 (69,5)	19 (100)	

FONTE: O autor (2009)

NOTA: \*O valor de P foi calculado pelo teste exato de Fisher.

†O valor de P foi obtido pela comparação do grau histológico 1 com o 3.

‡O N excluiu os casos ND (não determinados).

IAL = invasão angiolinfática; HER2 = *Human epidermal growth factor receptor-type 2*.

Nesta comparação, observou-se que a LOH em apenas um gene apresentou relação com invasão angiolinfática e superexpressão da proteína HER2. As demais variáveis distribuíram-se de forma independente em relação à LOH, refutando a hipótese H1.

#### 4.4 SOBREVIDA DAS 72 PACIENTES INFORMATIVAS

Durante o seguimento, os óbitos registrados ocorreram sempre em razão do câncer de mama, pela progressão da doença com recidiva local ou metástases à



distância. Portanto, a sobrevida global foi igual à sobrevida doença-específica, doravante considerada apenas como sobrevida. Então, nenhuma morte foi censurada nos cálculos estatísticos. Após o seguimento médio de 48 meses, 18 (25%) mortes foram registradas. Várias pacientes apresentaram metástases em mais de uma localização. Os locais mais frequentes foram: ossos (nove casos), fígado (sete casos) e pulmão (quatro casos). Uma paciente com metástases ósseas também apresentou recidiva no plastrão. Os detalhes da evolução de cada paciente estão descritos no APÊNDICE 4.

O grupo PP foi o que apresentou o maior número de mortes com nove casos em 24 possíveis (37,5%), seguido pelo grupo AP+PA com 7 casos em 25 possíveis (28%). O grupo com menor frequência de mortes foi o AA com dois óbitos (8,7%) em 23 pacientes. A probabilidade de sobrevida em 5 anos foi de 73% para as 72 pacientes, pela curva de Kaplan-Meier. No GRÁFICO 1 e na TABELA 7 estão demonstradas as sobrevidas dos grupos em relação à LOH.

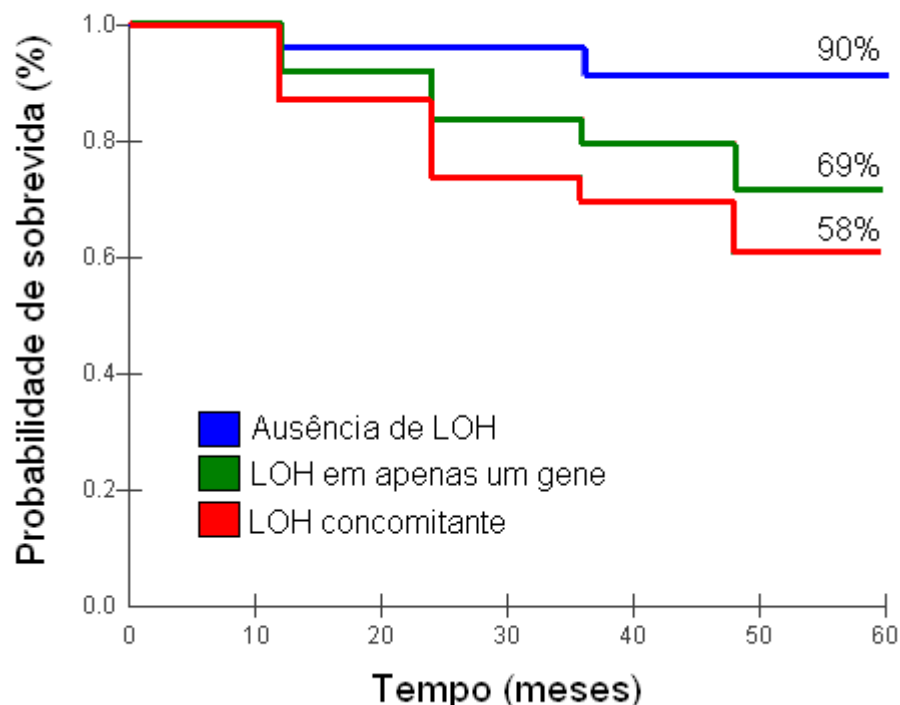


GRÁFICO 1 – CURVAS DE SOBREVIDA (5 ANOS) DE KAPLAN-MEIER EM RELAÇÃO À LOH

FONTE: O autor (2009)

TABELA 7 – PROBABILIDADE DE SOBREVIDA EM 5 ANOS PELA CURVA DE KAPLAN-MEIER

Grupo (N)	Sobrevida	IC 95%
PP (24)	58%	38% - 79%
AA (23)	90%	78% - 100%
AP+PA (25)	69%	51% - 88%
Total (72)	73%	62% - 83%

FONTE: O autor (2009)

NOTA: PP = LOH concomitante nos genes *BRCA1* e *FHIT*; AA = LOH ausente; AP+PA = LOH em apenas um gene (*BRCA1* ou *FHIT*)

As curvas de sobrevida foram comparadas pelo teste de LOG-rank. Observou-se que a perda concomitante da heterozigose nos genes *BRCA1* e *FHIT* diminuiu significativamente a sobrevida ( $P = 0,014$ ) em relação às pacientes sem LOH. Todavia, a perda da heterozigose em somente um dos genes não alcançou valor estatisticamente significante ( $P = 0,081$ ). As outras variáveis que também influenciaram na sobrevida foram: grau histológico, tamanho do tumor, invasão angiolinfática e *status* axilar. As demais variáveis (idade, receptor hormonal e HER2) não influenciaram na sobrevida, como demonstrada na TABELA 8.

TABELA 8 – ANÁLISE UNIVARIADA DA SOBREVIDA PELO TESTE LOG-RANK

Variável	Qui-quadrado ( $\chi^2_1$ )	Valor de P
LOH (PP vs. AA)	5,97	0,0145
LOH (AP+PA vs. AA)	3,02	0,081
Idade (< 50 anos vs. $\geq$ 50 anos)	0,0029	0,95
Grau histológico (3 vs. 1)	30,03	<0,0001
Tamanho do tumor ( $\leq$ 20 mm vs. > 20 mm)	5,20	0,0225
Axila (positiva vs. negativa)	9,73	0,0018
IAL (presente vs. ausente)	7,43	0,0064
RH (presente vs. ausente)	3,31	0,0688
Superexpressão HER2 (presente vs. ausente)	2,00	0,1572

FONTE: O autor (2009)

NOTA: PP = LOH concomitante nos genes *BRCA1* e *FHIT*; AA = LOH ausente; AP+PA = LOH em apenas um gene (*BRCA1* ou *FHIT*); IAL = invasão angiolinfática; RH = receptor hormonal; HER2 = *Human epidermal growth factor receptor-type 2*; vs = *versus*

Os GRÁFICOS 2 a 9 demonstram as curvas de sobrevida das oito variáveis avaliadas pelo teste de LOG-rank.

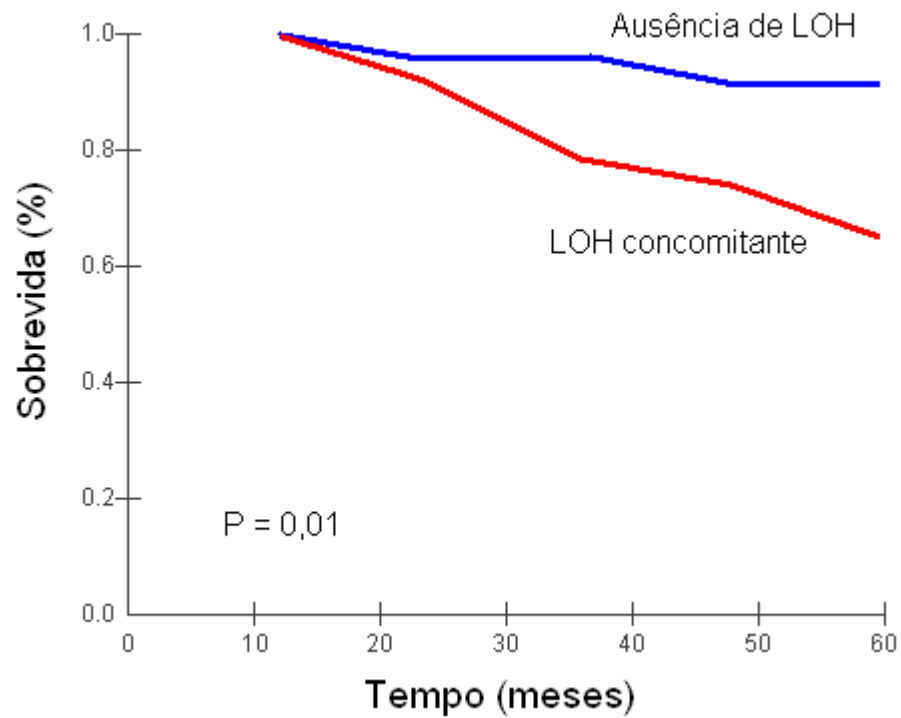


GRÁFICO 2 – SOBREVIDA: ANÁLISE UNIVARIADA PARA LOH

FONTE: O autor (2009)

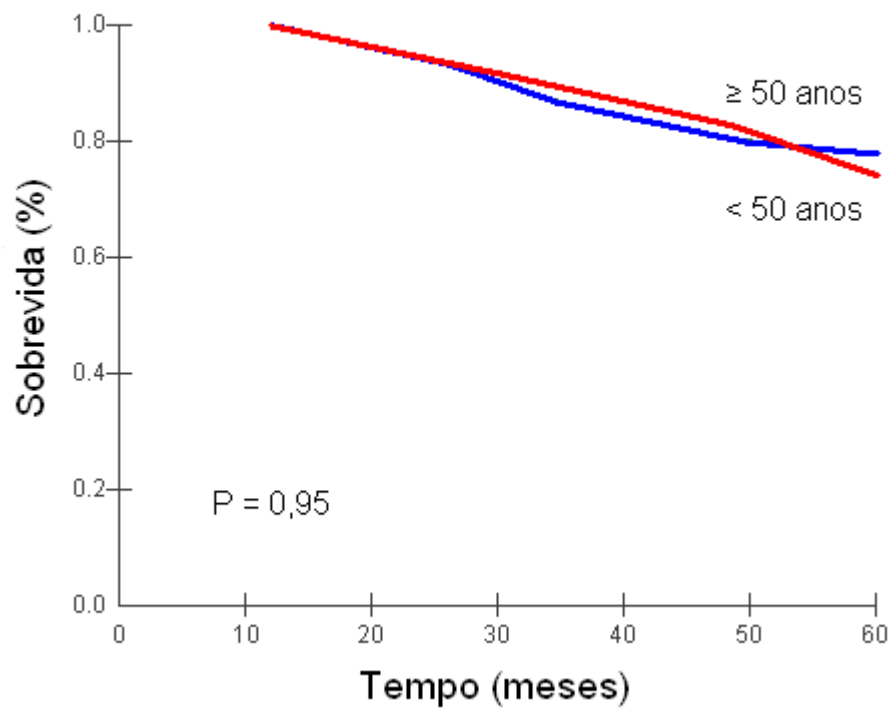


GRÁFICO 3 – SOBREVIDA: ANÁLISE UNIVARIADA PARA IDADE

FONTE: O autor (2009)

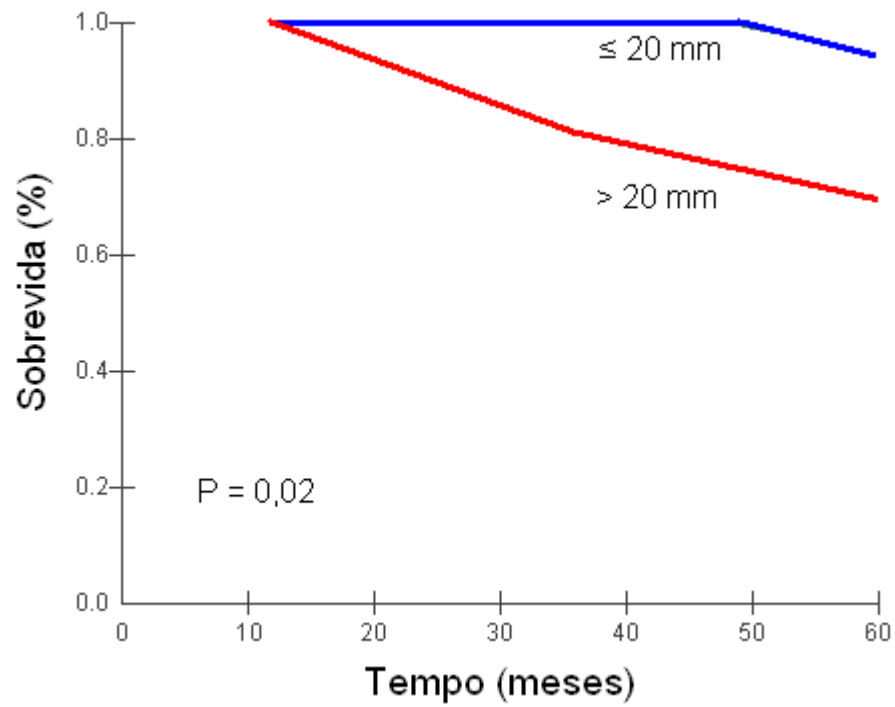


GRÁFICO 4 – SOBREVIDA: ANÁLISE UNIVARIADA PARA TAMANHO DO TUMOR  
 FONTE: O autor (2009)

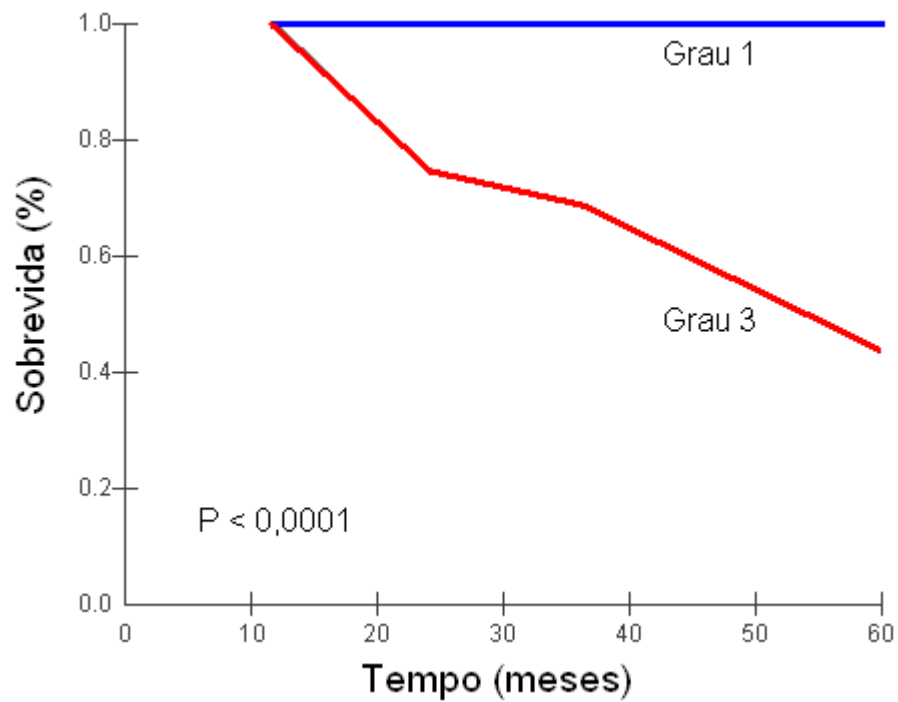


GRÁFICO 5 – SOBREVIDA: ANÁLISE UNIVARIADA PARA GRAU HISTOLÓGICO  
 FONTE: O autor (2009)

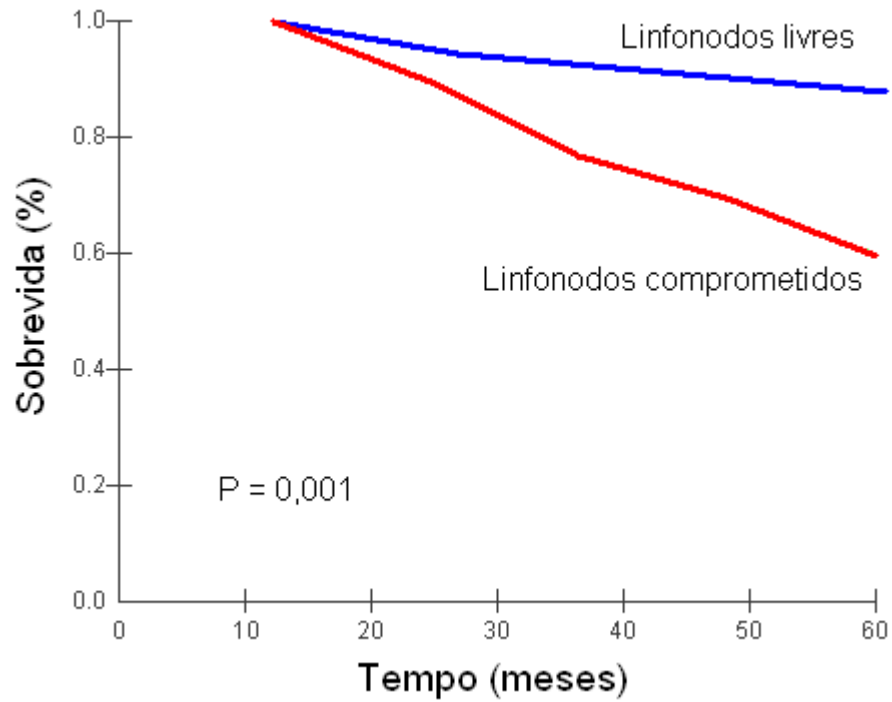


GRÁFICO 6 – SOBREVIDA: ANÁLISE UNIVARIADA PARA *STATUS* AXILAR  
 FONTE: O autor (2009)

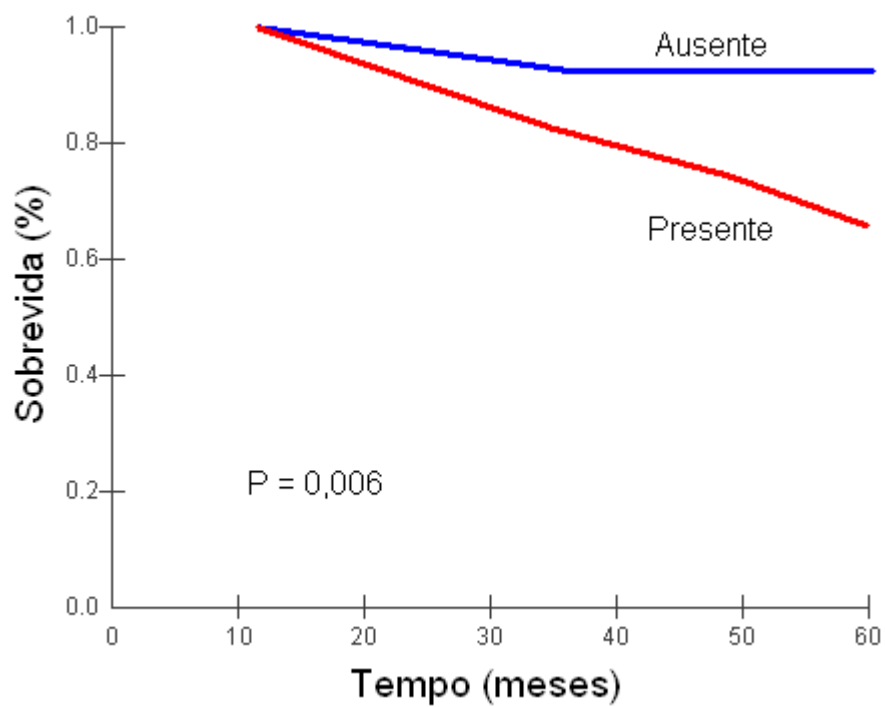


GRÁFICO 7 – SOBREVIDA: ANÁLISE UNIVARIADA PARA INVASÃO ANGIOLINFÁTICA  
 FONTE: O autor (2009)

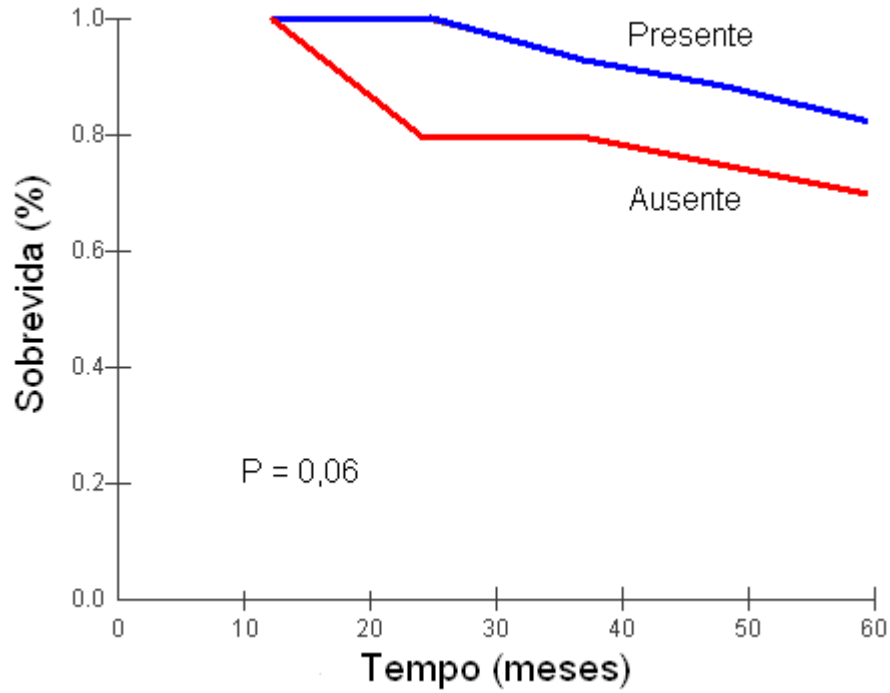


GRÁFICO 8 – SOBREVIDA: ANÁLISE UNIVARIADA PARA RECEPTOR HORMONAL (ESTROGÊNIO E/OU PROGESTERONA)

FONTE: O autor (2009)

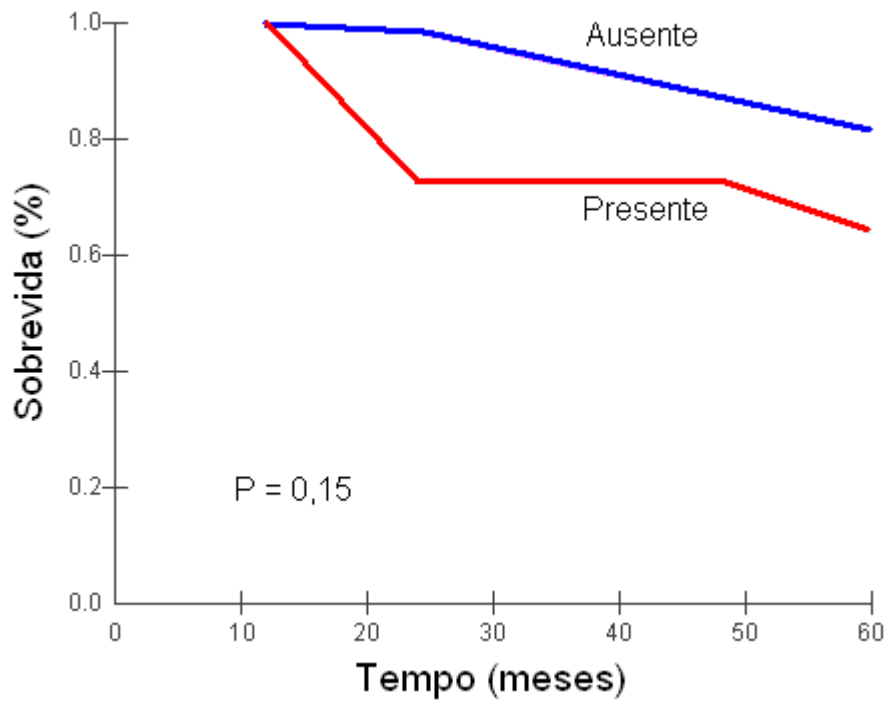


GRÁFICO 9 – SOBREVIDA: ANÁLISE UNIVARIADA PARA SUPEREXPRESSÃO DA PROTEÍNA HER2

FONTE: O autor (2009)

A análise de COX: modelo de risco proporcional demonstrou que a LOH concomitante dos genes *BRCA1* e *FHIT*, axila positiva e invasão angiolinfática presente aumentaram o risco de morte das pacientes, com  $P < 0,05$ . Portanto, estas variáveis apresentaram valor prognóstico independente. Embora tumores  $> 20$  mm, grau histológico 3, idade  $< 50$  anos e presença de superexpressão da HER2 apresentassem um *Hazard ratio* aumentado para morte, não alcançaram valor estatisticamente significativo. A variável RH (receptor hormonal) apresentou *Hazard ratio*  $< 1$  (0,47), demonstrando que a presença de RH diminuiu o risco de morte, embora com  $P > 0,05$  (TABELA 9).

TABELA 9 – ANÁLISE MULTIVARIADA DA SOBREVIDA PELO TESTE DE COX: MODELO DE RISCO PROPORCIONAL

Variável	<i>Hazard ratio</i>	IC 95%	Valor de P
LOH			
PP vs. AA	4,99	1,07 – 23,15	0,03
AP+PA vs. AA	3,56	0,73 – 17,17	0,11
Tamanho do tumor			
$> 20$ mm vs. $\leq 20$ mm	5,72	0,76 – 43,03	0,09
Grau histológico			
3 vs. 1 e 2	1,34	0,84 – 2,14	0,21
Idade (anos)			
$< 50$ vs. $\geq 50$	1,10	0,43 – 2,77	0,83
<i>Status</i> axilar			
Comprometida vs. livre	5,34	1,86 – 15,36	0,001
IAL			
Presente vs. ausente	6,02	1,38 – 26,27	0,01
RH			
Presente vs. ausente	0,47	0,17 – 1,31	0,15
Superexpressão HER2			
Presente vs. ausente	2,01	0,63 – 6,34	0,23

FONTE: O autor (2009)

NOTA: IC = intervalo de confiança; PP = LOH concomitante nos genes *BRCA1* e *FHIT*; AA = LOH ausente; AP+PA = LOH em apenas um gene (*BRCA1* ou *FHIT*); IAL = invasão angiolinfática; RH = receptor hormonal; HER2 = *Human epidermal growth factor receptor-type 2*; vs = *versus*

Os achados da TABELA 9 estão demonstrados nos GRÁFICOS 10 a 17.

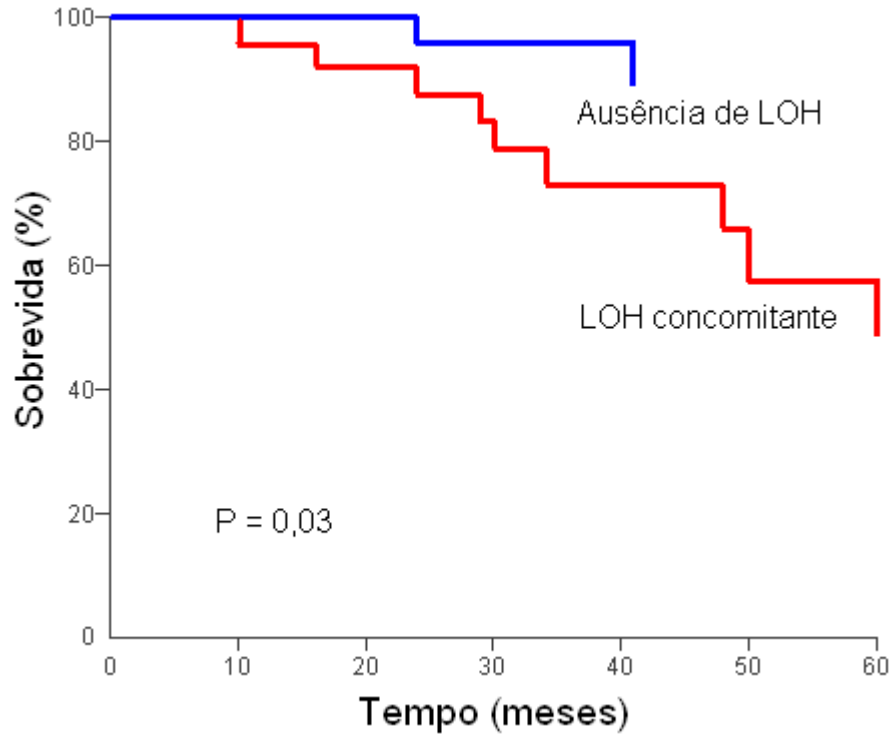


GRÁFICO 10 – SOBREVIDA: ANÁLISE MULTIVARIADA PARA LOH  
 FONTE: O autor (2009)

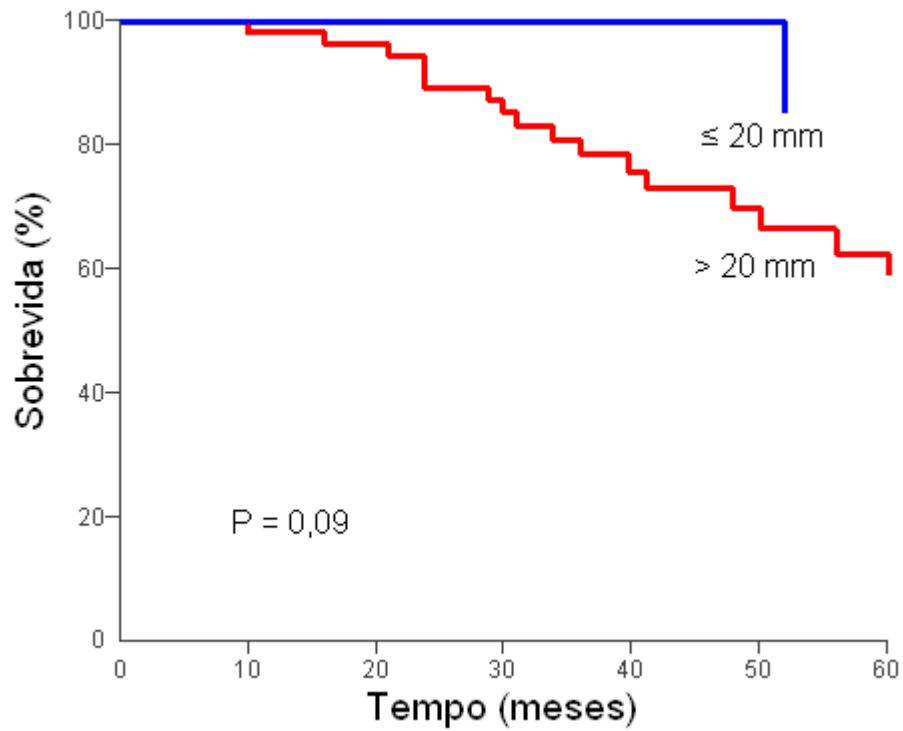


GRÁFICO 11 – SOBREVIDA: ANÁLISE MULTIVARIADA PARA TAMANHO DO TUMOR  
 FONTE: O autor (2009)



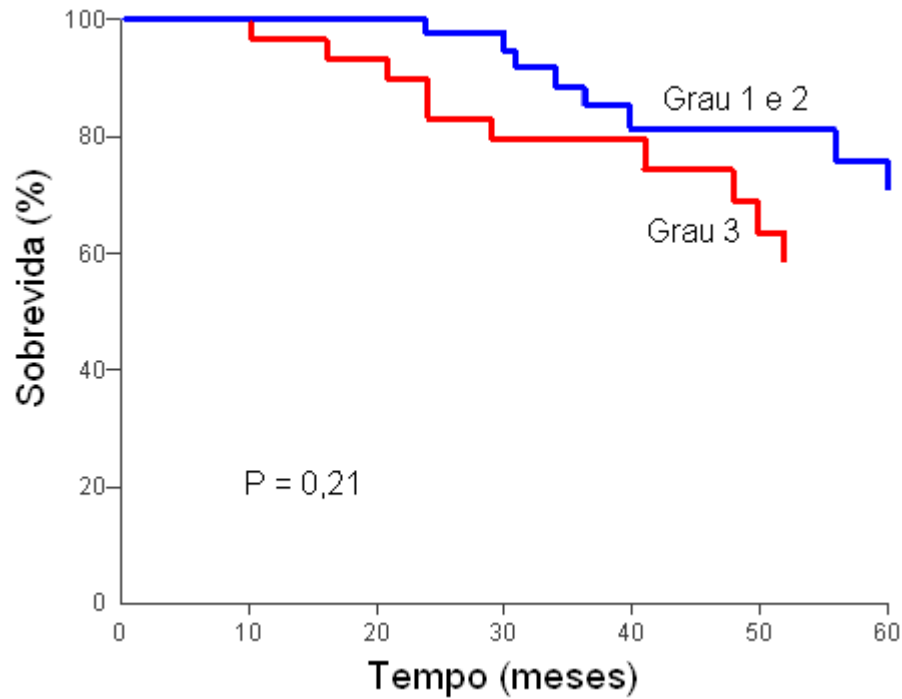


GRÁFICO 12 – SOBREVIDA: ANÁLISE MULTIVARIADA PARA GRAU HISTOLÓGICO

FONTE: O autor (2009)

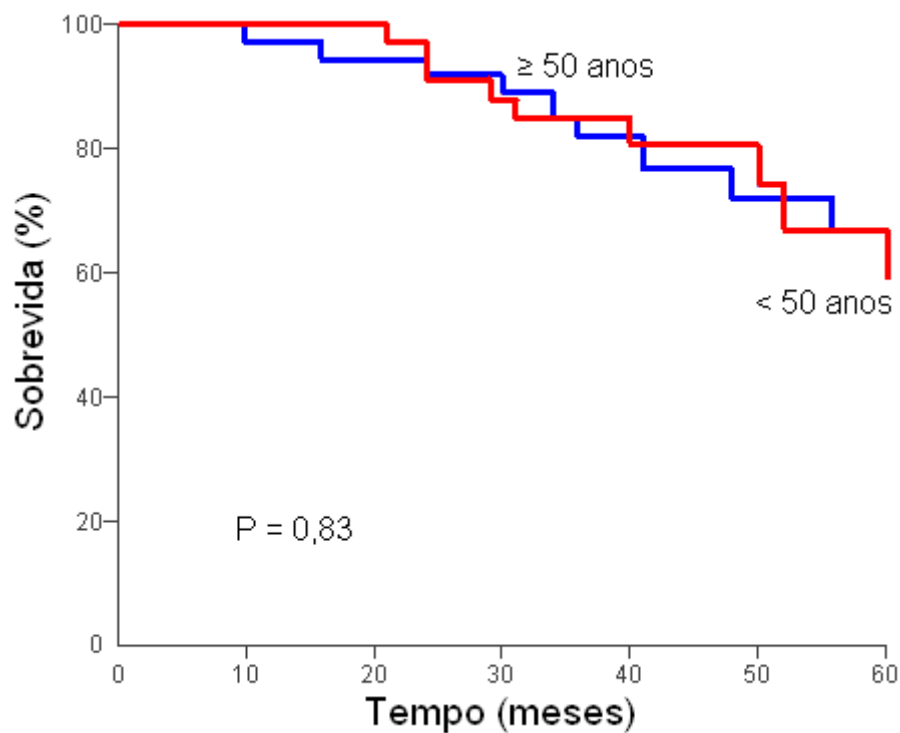


GRÁFICO 13 – SOBREVIDA: ANÁLISE MULTIVARIADA PARA IDADE

FONTE: O autor (2009)

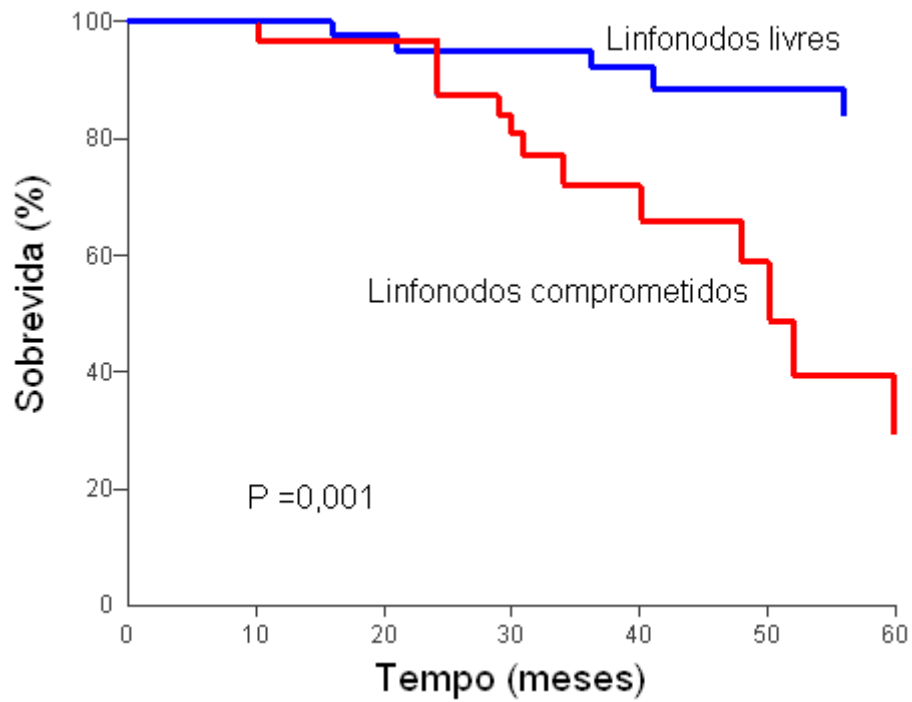


GRÁFICO 14 – SOBREVIDA: ANÁLISE MULTIVARIADA PARA *STATUS* AXILAR  
 FONTE: O autor (2009)

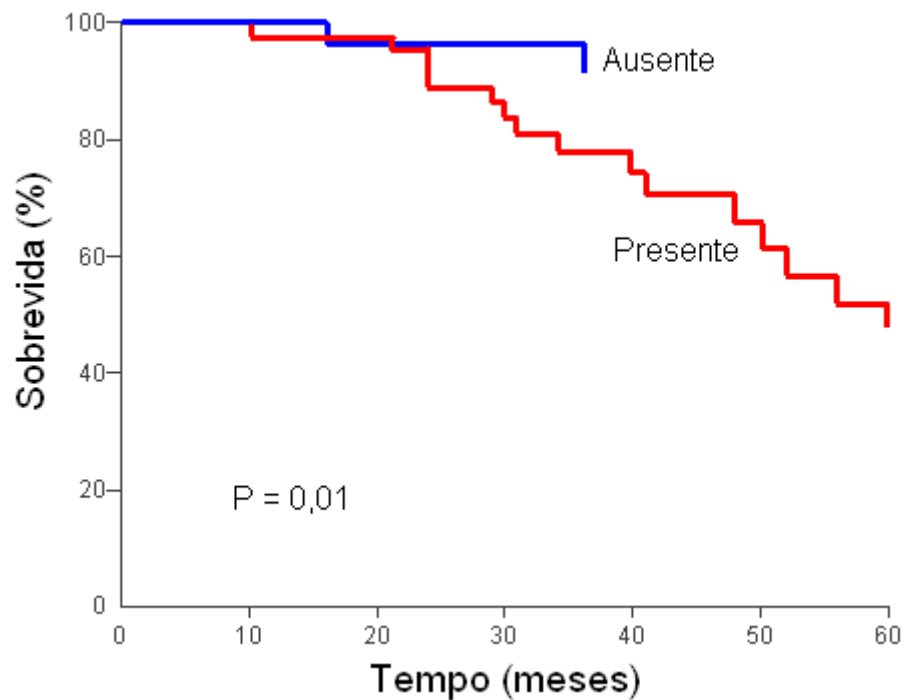


GRÁFICO 15 – SOBREVIDA: ANÁLISE MULTIVARIADA PARA INVASÃO ANGIOLINFÁTICA

FONTE: O autor (2009)

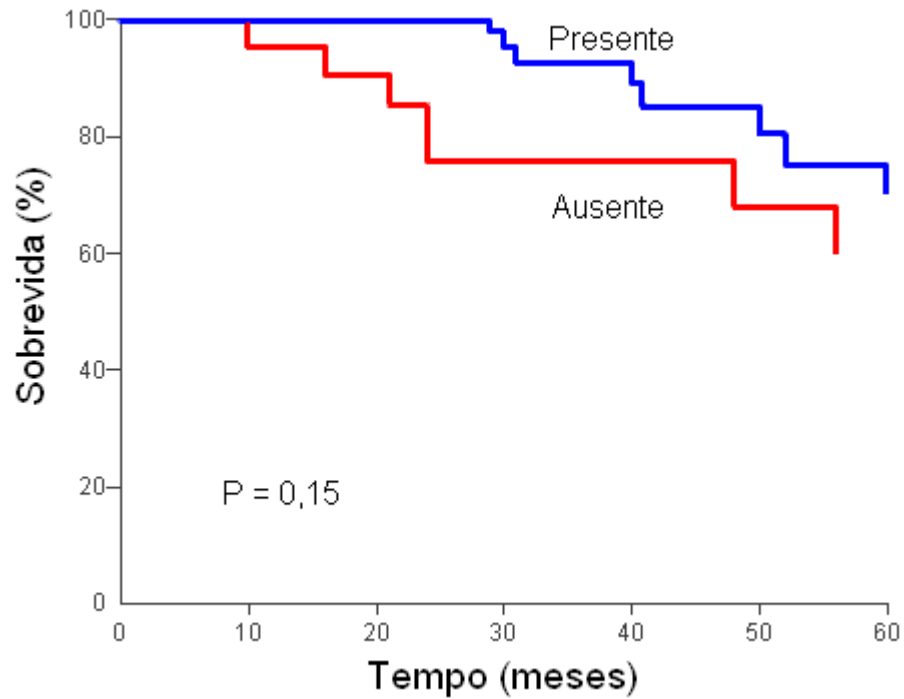


GRÁFICO 16 – SOBREVIDA: ANÁLISE MULTIVARIADA PARA RECEPTOR HORMONAL (ESTROGÊNIO E/OU PROGESTERONA)

FONTE: O autor (2009)

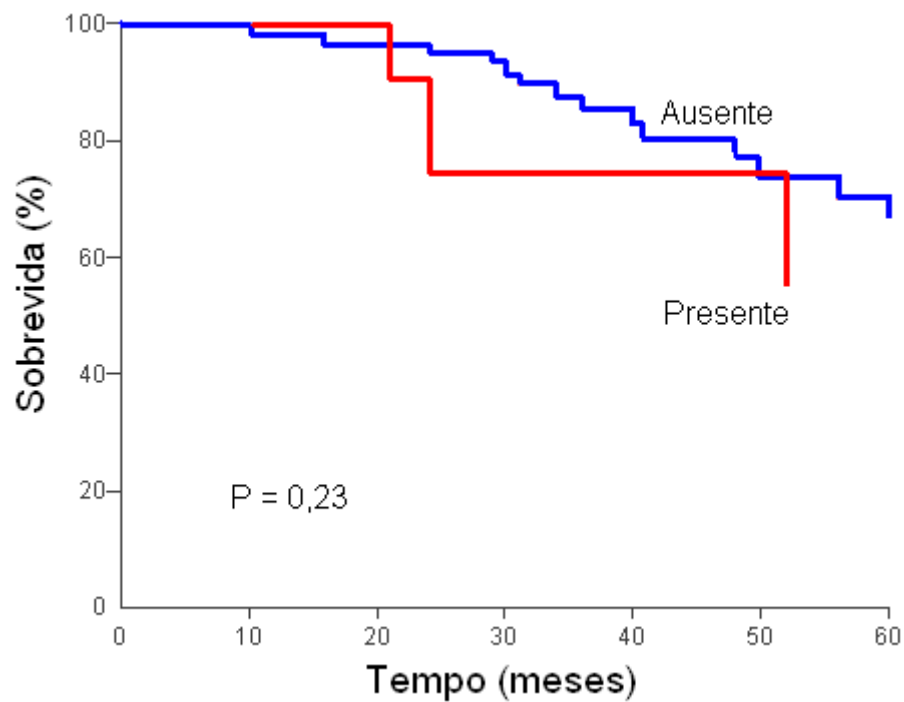


GRÁFICO 17 – SOBREVIDA: ANÁLISE MULTIVARIADA PARA SUPEREXPRESSÃO DA PROTEÍNA HER2

FONTE: O autor (2009)

#### 4.5 METÁSTASES À DISTÂNCIA

Ao final do seguimento, entre as pacientes vivas, foi observada a presença de metástases ósseas em duas pacientes do grupo PP e uma paciente do grupo AA. Não foi constatada a presença de metástase visceral. Os detalhes sobre a localização das metástases estão no APÊNDICE 4.

## 5 DISCUSSÃO

Apesar dos anos de estudos intensivos e progressos substanciais na compreensão do câncer de mama, este persiste como uma causa importante de morte entre as mulheres. Nesse sentido, a busca por alterações moleculares que auxiliem na identificação do comportamento tumoral e sejam oportunidades de terapia alvo é uma linha de pesquisa que tem despertado grande interesse.

### 5.1 FORMULAÇÃO DA HIPÓTESE

A formulação da hipótese deste trabalho foi baseada em tema de opiniões conflitantes na literatura médica: relacionar o gene *BRCA1* ao câncer esporádico de mama. Prova disto, é a pergunta feita no ano 2000 por Haber e publicada na revista *New England Journal of Medicine (NEJM)*:

Por que o câncer de mama deveria ocorrer em portadores de mutação germinativa em um alelo do gene *BRCA1*, após a perda somática do segundo alelo, considerando que o *BRCA1* raramente, ou nunca, é inativado em pacientes com câncer de mama esporádico? (HABER, 2000, p. 1568).

#### 5.1.1 O gene *BRCA1* e o câncer esporádico de mama

Desde que a professora do departamento de genética da Universidade da Califórnia, em Berkeley, Mary-Claire King e seus colegas (HALL *et al.*, 1990) localizaram o gene *BRCA1*, há 19 anos, até julho de 2009, 6,68 mil artigos relacionados ao tema foram indexados na base de dados MEDLINE. Passada a euforia inicial, Wooster e Weber (2003) definiram que o gene *BRCA1* estava mutado em 20% das famílias com evidência de susceptibilidade herdada para o câncer de mama. Para fechar os 100%, o gene *BRCA2* seria responsável por mais 20%, o gene *CHEK2* por 5%, o gene *TP53* por 1% ou menos e 54% das mutações restantes

ocorreriam em genes desconhecidos e com baixa penetrância. Como Wooster e Weber (2003) não relacionaram o gene *BRCA1* ao câncer esporádico de mama, concluíram que, somados os tipos familiares e esporádicos, o mesmo seria responsável por apenas 2% a 3% de todos os cânceres de mama.

Por outro lado, conforme revisão de literatura realizada, ficou evidente que, embora a mutação do gene *BRCA1* no câncer esporádico de mama seja um evento raro, a LOH e a diminuição da expressão do gene *BRCA1* ocorrem em aproximadamente 30% dos casos.

Além disso, alterações epigenéticas, como a hipermetilação de ilhas de CpG (citosina que precede guanina) na região promotora do gene *BRCA1* foram sugeridas como a segunda lesão no modelo das *two hit* de Knudson. Neste caso, a mudança na expressão do gene não se reflete em alterações na sequência do DNA (ESTELLER, 2008). Portanto, a soma dos 2% a 3% dos hereditários com os 30% dos esporádicos permite supor que o gene *BRCA1* esteja relacionado a, aproximadamente, um terço de todos os cânceres de mama.

Outra argumentação contra a participação do gene *BRCA1* no câncer esporádico de mama é que este só deixa de funcionar quando os dois alelos estão mutados (fenótipo recessivo). Portanto, seriam improváveis mutações no decorrer da vida envolvendo os dois alelos na região 17q21. Entretanto, Mueller e Roskelley (2003), sem discordar de que as mutações sejam improváveis, sugerem que a diminuição de expressão do gene *BRCA1* é decorrente de alterações genéticas (LOH) e epigenéticas (hipermetilação) que resultam na perda total da sua função como supressor tumoral.

Nesse sentido, quem ratificou as suposições de outros trabalhos e respondeu à pergunta de Haber (2000) foram Birgisdottir *et al.* (2006), ao avaliarem a metilação e LOH do gene *BRCA1* em 143 casos de câncer esporádico de mama. Foi observada a metilação do *BRCA1* em 13 dos 143 casos (9,1%) e diminuição da expressão da proteína BRCA1 em 9 destes 13 casos. Destes 9 casos, com presença de metilação e diminuição ou ausência da expressão do gene, em sete casos também ocorreu a LOH do gene *BRCA1*. Este estudo demonstrou que a inativação epigenética e a deleção do gene *BRCA1* podem explicar a teoria de Knudson (inativação dos dois alelos) na gênese do câncer esporádico de mama. Portanto, parece razoável afirmar que o gene *BRCA1* não é exclusividade do câncer

hereditário de mama. Turner, Tutt e Ashworth (2004) denominaram estes tumores esporádicos de mama como *BRCAness*.

### 5.1.2 Relação *BRCA1:FHIT*

Definitivamente, os genes *BRCA1* e *FHIT* não são os únicos genes relacionados ao câncer de mama. Lerebours e Lidereau (2002) descreveram 18 regiões que apresentaram deleção ou amplificação, em ao menos 20% dos cânceres de mama, nas séries em que foram avaliadas. Nestas regiões há 39 genes como possíveis responsáveis pela gênese tumoral e entre eles, encontram-se os genes *BRCA1* e *FHIT*. O raciocínio para associar estes dois genes na mesma linha de pesquisa partiu do gene *BRCA1*, que apresenta características de gene supressor tumoral do tipo *caretaker*. Uma vez este gene inativo, cria-se o ambiente para novas mutações cromossômicas. A perda concomitante da LOH no gene *BRCA1* e em outros genes (*BRCA2*, *RE*, *TP53*, *ATM*) já foi descrita. Estes tumores apresentaram, em geral, pior prognóstico (SILVA *et al.*, 1999). A região *FRA3B*, no loco do gene *FHIT*, considerada a região frágil comum mais ativa do cromossomo humano (GLOVER; STEIN, 1988) surgiu, então, como uma localização provável de alterações concomitantes ao gene *BRCA1*. Entretanto, é importante ressaltar que o gene *FHIT* pode sofrer alterações nas fases iniciais da gênese tumoral, independente de lesões no gene *BRCA1* (HUEBNER; CROCE, 2001). Os nossos resultados corroboraram esse fato, já que em 11 casos (15,2%) a LOH do gene *FHIT* ocorreu sem a LOH no gene *BRCA1*. Santos *et al.* (2004) também observaram a LOH do gene *FHIT* em dois casos (de seis possíveis) sem a presença de LOH no gene *BRCA1*, sugerindo que a LOH do gene *FHIT* nem sempre é consequência da LOH no gene *BRCA1*, muito embora o gene *BRCA1* seja importante para a manutenção do sítio frágil comum *FRA3B* e do gene *FHIT* (TURNER *et al.*, 2002).

## 5.2 SOBRE AS PACIENTES

Um dos cuidados na seleção das pacientes foi com relação ao tratamento, já que este interfere no prognóstico e pode levar a um erro sistemático dos resultados. Seguindo este raciocínio, foram excluídas as pacientes que não se submeteram ao tratamento proposto e as que receberam tratamento prévio à cirurgia, já que algumas variáveis, como tamanho tumoral e comprometimento axilar, determinadas pelo laudo anatomopatológico da peça de ressecção cirúrgica, estariam sujeitas a alterações antes de serem avaliadas pelo patologista. Embora estes cuidados na inclusão e exclusão tenham diminuído a importância do tratamento como viés de confusão, por outro lado podem ter gerado um viés de seleção. Esta possibilidade, inerente aos trabalhos retrospectivos, pode diminuir a precisão dos resultados e deve ser levada em consideração na análise dos mesmos. Uma pesquisa prospectiva de fator prognóstico, embora menos sujeita a este tipo de viés, só seria teoricamente perfeita se os participantes não recebessem nenhum tipo de tratamento, o que, eticamente, não seria aceitável.

Com relação às características das pacientes e dos tumores, os achados se aproximaram de outras séries nacionais publicadas sobre câncer de mama. Comparar esta amostra com dados de outros países não é o ideal, porque o comportamento do câncer de mama diverge entre grupos étnicos diferentes. Por exemplo, dados atuais do *Surveillance, Epidemiology and End Results* (SEER, 2009) revelam que a idade média de diagnóstico do câncer de mama nos Estados Unidos da América (EUA) é 60 anos. No Paraná, a maior série publicada que se tem conhecimento envolveu 2,144 mil pacientes, tratadas no Hospital Erasto Gaertner, entre os anos de 1973 e 1999. A idade média das pacientes foi 45,3 anos (HATSCHBACH *et al.*, 2003). Portanto, a nossa série apresentou uma média de idade intermediária entre os valores citados (51,8 anos) e a maioria (56%) das pacientes estava entre a quarta e sexta década de vida.

Também merece ser considerada a alta taxa do tipo histológico ductal infiltrante (CDI) em 91,4% dos casos. O fato de o tipo histológico ser definido por critérios de exclusão (sem outra especificação – SOE) pode ter sido motivo de superestimação do seu diagnóstico em detrimento dos demais. Este é um fenômeno



já descrito para justificar a ampla variação de frequência (49% a 80%) do carcinoma ductal nas séries publicadas (CARVALHO, 2007).

Segundo Li, Daling e Malone (2003), a proporção global de câncer de mama com RH (receptor hormonal) positivo para estrogênio e progesterona é de 62,3%. Na nossa casuística, 60,9% apresentaram RE e RP positivos.

Finalmente, a frequência de superexpressão da HER2 foi de 15,8% na nossa série. A média observada na literatura é de 15 a 30% (ROSS; FLETCHER, 1998).

### 5.3 SOBRE O MÉTODO

#### 5.3.1 Extração de DNA em tecido fixado

A avaliação do DNA da célula tumoral pode ser feita em tecido fresco ou já fixado em formalina e embocado em parafina. Cawkwell *et al.* (1993), ao descrever o método de verificação de LOH utilizado neste trabalho, salientou que o mesmo também é possível em tecido fixado. Entretanto, fatores como tempo de armazenamento e técnica de fixação do tecido podem interferir na qualidade do DNA extraído. A má qualidade do DNA foi determinante para a exclusão de 39 pacientes deste estudo e deve ser levada em consideração como outra possibilidade de viés de seleção. Na literatura pesquisada, há exemplos de sucesso na descoberta de fatores prognósticos tanto na análise de tecido fresco ou congelado quanto na análise de tecido fixado e as duas formas são passíveis de críticas. A técnica de *microarray* (PEROU *et al.*, 2000), por exemplo, é realizada com tecido fresco ou conservado congelado. Uma desvantagem deste método é que o fragmento de tecido para análise pode não ser representado apenas por tecido tumoral. Além disso, dificuldades para armazenar o tecido tumoral congelado a menos 80 °C podem inviabilizar o uso da técnica.

A análise do DNA de tecido fixado em formalina pode ser mais trabalhosa, conforme descrita na metodologia deste estudo, mas permite a avaliação de pacientes que já foram operadas há meses ou anos. Portanto, facilita a descoberta

de novos marcadores prognósticos, como o índice de expressão *HOXB13:IL17BR* (MA *et al.*, 2006), realizado com 852 amostras de tecido tumoral mamário previamente fixado e o ONCOTYPE DX™, determinado pela avaliação de 21 genes, em 668 amostras tumorais também fixadas, para avaliar a probabilidade de recorrência do câncer de mama RE positivo em pacientes com axila negativa (PAIK *et al.*, 2004).

### 5.3.2 Os marcadores e as 10 pacientes não informativas

Foram utilizados três marcadores para o loco 3p14.2 e três marcadores para o loco 17q21. Com isso, 10 pacientes não foram informativas quanto à LOH porque eram homozigotas nas três sequências avaliadas em uma das regiões. Esta situação pode ser minimizada com o aumento do número de marcadores para a região avaliada. Existem 86 marcadores para o gene *FHIT* e 68 marcadores para o gene *BRCA1* catalogados no *Genome Database* (2009). Contudo, se por um lado o aumento no número de marcadores diminui o número de casos não informativos, por outro lado, aumenta o tempo e dificuldade de reprodução da técnica. Futreal *et al.* (1994) utilizaram três marcadores para avaliação da LOH no gene *BRCA1*, sendo que um dos marcadores não era intragênico. Justifica-se a utilização de marcadores que “flanqueiem” o gene, seja em situação centromérica ou telomérica, pelo fato de que as deleções nestas regiões próximas ao gene, quando ocorrem, também atingem o loco do gene. Em nosso estudo, os três marcadores do gene *FHIT* e dois marcadores do gene *BRCA1* são intragênicos. Apenas o marcador D17S791 está próximo ao gene, em situação telomérica a este. Os estudos de Nagai *et al.* (1994) e Cropp *et al.* (1994) utilizaram 10 e 17 marcadores respectivamente. Nesses estudos, foram estudadas regiões centroméricas e teloméricas ao gene *BRCA1*. A maioria dos estudos que avaliaram apenas os locos *BRCA1* ou *FHIT* utilizou entre três e cinco marcadores.

## 5.4 SOBRE OS RESULTADOS

Antes de se discutir resultados é importante considerar que o tamanho (N) da amostra deste estudo foi pequeno. Pesquisas que validaram marcadores prognósticos no câncer de mama para utilização na rotina e prática diária envolveram várias centenas de trabalhos e milhares de pacientes, como, por exemplo, para validação do HER2. Apesar disto, mesmo com um N reduzido, foi alcançado valor estatístico para os achados. Logo, este trabalho deve ser analisado como um estudo de nível III, no sistema de graduação para pesquisas de marcador tumoral, proposto pela *American Society of Clinical Oncology* (ASCO), denominado *The Tumor Marker Utility Grading System* (TMUGS). O nível III é um nível intermediário, no qual figuram os estudos retrospectivos, com amostras relativamente pequenas, mas que permitem análise estatística, cujo principal objetivo é a geração de hipóteses ou de uma linha de pesquisa a ser validada por outros estudos, prospectivos e com maior número de pacientes avaliadas (HENRY; HAYES, 2006).

### 5.4.1 LOH dos genes *BRCA1* e *FHIT*

A LOH dos genes *BRCA1* e *FHIT* ocorreu em 51,4% e 47,5% das 82 pacientes avaliadas, respectivamente. Em 24 casos (33,3%) a LOH ocorreu concomitante nos dois genes. Na revisão da literatura deste estudo, verificou-se que a frequência de LOH no gene *BRCA1* variou de 30% a 64,5% (CROPP *et al.*, 1994; JOHNSON; SHAW; WALKER, 2002). Para o gene *FHIT*, a LOH variou de 16% a 37,5% (HUIPING *et al.*, 2000; AHMADIAN *et al.*, 1997). Portanto, os valores obtidos na nossa casuística foram expressivos. Com relação ao gene *BRCA1*, a frequência ficou na faixa de variação observada na literatura, mas acima da média dos demais artigos avaliados. Para o gene *FHIT*, a frequência de LOH foi a maior já registrada. Estes dados demonstram que três marcadores por gene podem ser o número ideal, em termos de tempo e custo-benefício, na aplicação da técnica de LOH. Não foram

considerados aqui os artigos que avaliaram a expressão da proteína BRCA1 ou FHIT.

#### 5.4.2 Relação da LOH concomitante com as demais variáveis

Esta relação foi avaliada pelo teste exato de Fisher, pois em algumas comparações as frequências eram baixas (menores que cinco) ou nulas.

Conforme demonstrado, houve associação estatisticamente significativa entre a presença concomitante de LOH e tumores maiores que 20 mm, grau histológico 3, axila comprometida, presença de IAL e RH negativo. Todas as variáveis citadas são classicamente conhecidas como fatores de mau prognóstico no câncer de mama. Esta associação já havia sido descrita tanto para a LOH do *BRCA1* (RIO *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 1999) quanto para a do *FHIT* (INGVARSSON *et al.*, 2001) de forma isolada. Portanto, os resultados obtidos nesta pesquisa são semelhantes aos já publicados e sugerem que a associação da LOH nos genes *BRCA1* e *FHIT* pode ter potencializado o fenótipo mais agressivo destes tumores.

#### 5.4.3 Sobrevida: análise univariada

O teste de LOG-rank demonstrou que a sobrevida das pacientes com LOH concomitante nos genes *BRCA1* e *FHIT* foi menor que a das pacientes sem LOH ( $P < 0,05$ ). Embora vários artigos tenham sugerido esta hipótese, tanto para o gene *BRCA1* quanto para o gene *FHIT*, poucos conseguiram afastar a hipótese da nulidade até então. Somente Yang *et al.* (2001), pela expressão da proteína FHIT e Ingvarsson *et al.* (2001), pela análise da LOH do *FHIT*. Ginistier *et al.* (2003) também demonstraram a influência da expressão da FHIT na sobrevida das pacientes com câncer de mama em estágio inicial. Já as pacientes com LOH em apenas um gene tiveram apenas uma tendência a pior prognóstico ( $P = 0,06$ ). Todas as demais variáveis se comportaram de maneira semelhante ao já observado na literatura, com relação a suas características como fator prognóstico no câncer de mama.

#### 5.4.4 Sobrevida: análise multivariada

Além da LOH concomitante, apenas as variáveis *status* axilar e IAL demonstraram aumento para o risco de morte com  $P < 0,05$  e alcançaram valor estatístico como fator prognóstico independente. Yang *et al.* (2001) demonstraram que a diminuição da expressão da proteína FHIT diminuiu a sobrevida, pelo teste de LOG-rank ( $P = 0,0086$ ), mas não foi significativa na análise de COX ( $P = 0,0563$ ). Ingvarsson *et al.* (2001) demonstraram, em análise multivariada, a LOH do gene *FHIT* como um fator de mau prognóstico no câncer de mama.

As demais variáveis (exceto RH), embora demonstrassem *Hazard ratio*  $> 1$ , sempre tiveram o número 1 contido no IC 95%, ou seja, não conseguiram refutar a hipótese de que a sobrevida pudesse ser igual nas duas possibilidades comparadas. Por exemplo, para a variável tamanho do tumor, as duas possibilidades eram:  $> 20$  mm e  $\leq 20$  mm. O *Hazard ratio* foi 5,72, mas com um IC 95% de 0,76 a 43,03, ou seja, admitindo a possibilidade eventual do *Hazard ratio* ser igual a 1 e, neste caso, sem diferença de sobrevida. Já a variável RH apresentou *Hazard ratio* de 0,47, ou seja, diminuiu o risco de morte para as pacientes com RH presente, porém, também com IC 95% de 0,17 a 1,31 e por isso com  $P > 0,05$ . Portanto, um dado sem valor estatístico. A explicação para IC 95% tão amplos e *Hazard ratio* maior ou menor que 1 não ser significativa se deve ao pequeno tamanho da amostra e, principalmente, ao número reduzido de eventos por variável. Este aspecto diminuiu a precisão deste teste estatístico, sem inviabilizá-lo, e sugere cautela na interpretação dos resultados.

#### 5.5 ATRIBUTOS DE UMA PESQUISA DE MARCADOR PROGNÓSTICO

Em razão do grande número de estudos sobre marcadores tumorais em oncologia, foi criado, em 2006, o *REporting recommendations for tumor MARKer prognostic studies* (REMARK), um guia com orientações para este tipo de pesquisa, com o objetivo de dar mais transparência e tornar mais completo os artigos publicados sobre este tema (McSHANE *et al.*, 2006). Com isso, possibilitar aos que

lêem o artigo, acesso a informações relevantes sobre o estudo, que permitam julgar a confiabilidade dos resultados e verificar em que contextos se aplicam as conclusões obtidas. Na descrição de todas as etapas deste trabalho foi dado ênfase a estas recomendações, principalmente na discussão das limitações deste estudo.

São considerados atributos indispensáveis a uma pesquisa de marcador prognóstico em câncer de mama, segundo Thor (2004):

- a) hipótese científica com fundamentação;
- b) amostra grande o suficiente para ter valor estatístico;
- c) tempo de seguimento adequado;
- d) análise estatística univariada e multivariada.

Poderiam, ainda, ser acrescentadas mais duas qualidades: uma metodologia de fácil reprodução e um marcador prognóstico com potencial para fator preditivo ou alvo terapêutico, assim como ocorreu com o RH e o HER2, por exemplo. A metodologia para extração do DNA e determinação da LOH, pela descrição minuciosa da técnica, parece desafiante. Porém, pode ser realizada por técnico competente em metodologias moleculares, do início ao fim do processo, em cinco a sete dias. Com relação ao potencial terapêutico, Fong *et al.* (2009) demonstraram que, de 19 pacientes com câncer de mama, ovário ou próstata, portadores de mutações germinativas nos genes *BRCA1* ou *BRCA2*, 12 (63%) se beneficiaram do uso da droga olaparib (AZD2281), um potente inibidor da poli (adenosina difosfato [ADP]-ribose) polimerase (PARP), que atua no reparo de quebras na molécula de DNA. Esse estudo, de fase 1, foi o primeiro relato de terapia alvo específica para células tumorais com deficiência no reparo do DNA por falha na recombinação homóloga. Em tese, essa falha na recombinação homóloga pode ser causada por mutações, herdadas ou adquiridas, em outros genes supressores tumorais.

O que se espera, com a nossa pesquisa, é que mais uma peça tenha sido montada neste gigante, complexo e fascinante quebra-cabeças que é o câncer de mama.

## 6 CONCLUSÃO

- a) a LOH concomitante dos genes *BRCA1* e *FHIT* ocorreu em 24 (33,3%) das 72 pacientes informativas com câncer esporádico de mama, o que correspondeu a um terço da amostra;
- b) a LOH concomitante dos genes *BRCA1* e *FHIT* apresentou associação estatisticamente significativa com: tamanho do tumor, grau histológico, IAL, *status axilar* e receptor hormonal. Não houve relação entre LOH e as variáveis idade e superexpressão da HER2.
- c) as pacientes com LOH concomitante dos genes *BRCA1* e *FHIT* tiveram sobrevida menor que as pacientes sem LOH, tanto na análise univariada quanto na multivariada, ao final do seguimento realizado. Com isso, a LOH concomitante dos genes *BRCA1* e *FHIT* foi um fator prognóstico independente nesta coorte de pacientes com câncer esporádico de mama.

## REFERÊNCIAS

AHMADIAN, M. *et al.* Analysis of the *FHIT* gene and *FRA3B* region in sporadic breast cancer, preneoplastic lesions and familial breast cancer probands. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 57, n. 17, p. 3664-3668, 1997.

ARUN, B. *et al.* Loss of FHIT expression in breast cancer is correlated with poor prognostic markers. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, Philadelphia, v. 14, n. 7, p. 1681-1685, 2005.

BARNES, L. D. *et al.* FHIT, a putative tumor suppressor in humans, is a dinucleoside 5',5''-P1,P3-triphosphate hydrolase. **Biochemistry**, Washington, v. 35, n. 36, p. 11529-11535, 1996.

BIBLIOTECA COCHARANE. São Paulo: Bireme/OPAS/OMS, 1967-2009. Disponível em: <<http://www.bireme.br/php/index.php>>. Acesso em: 4/7/2009.

BIRGISDOTTIR, V. *et al.* Epigenetic silencing and deletion of the *BRCA1* gene in sporadic breast cancer. **Breast Cancer Res.**, London, v. 8, n. 4, p. 38-48, 2006.

BRASIL. Resolução n. 196, de 10 de outubro de 1996. Aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos. **Diário oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 11 out. 1996. Disponível em: <<http://conselho.saude.gov.br/docs/Reso196.doc>>. Acesso em 12/5/2009.

BREIVIK, J. The evolutionary origin of genetic instability in cancer development. **Sem. Cancer Biol.**, London, v. 15, n. 1, p. 51-60, 2005.

CALIN, G. A. *et al.* Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 101, n. 9, p. 2999-3004, 2004.

CALLAHAN, R. *et al.* Definition of regions of the human genome affected by loss of heterozygosity in primary human breast tumors. **J. Cell Biochem. Suppl.**, New Jersey, v. 17G, p. 167-172, 1993.

CAMPLIGIO, M. *et al.* *FHIT* loss of function in human primary breast cancer correlates with advanced stage of the disease. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 59, n. 16, p. 3866-3869, 1999.



CARVALHO, F. M. Histopatologia. In: BARROS, A. C. S. D; BUZAID, A. C. **Câncer de mama – tratamento multidisciplinar**. São Paulo: Dendrix publicações, 2007. p. 3-25.

CASPERSSON, T.; ZECH, L.; JOHANSSON, C. Analysis of human metaphase chromosome set by aid of DNA-binding fluorescent agents. **Exp. Cell Res.**, Orlando, v. 62, n. 2, p. 490-492, 1970.

CAWKWELL, S. M. *et al.* Rapid detection of allele loss in colorectal tumours using microsatellites and fluorescent DNA technology. **Br. J. Cancer**, London, v. 67, n. 6, p. 1262-1267, 1993.

COX, L. A.; CHEN, G.; LEE, E. Y. H. P. Tumor suppressor genes and their roles in breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.**, Boston, v. 32, n. 1, p. 19-38, 1994.

CROCE, C. M. Oncogene and cancer. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 358, n. 5, p. 502-511, 2008.

CROPP, C. S. *et al.* Evidence for involvement of *BRCA1* in sporadic breast carcinomas. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 54, n. 10, p. 2548-2551, 1994.

ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histologic grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, Oxford, v. 19, n. 5, p. 403-410, 1991.

ESTELLER, M. Epigenetics in cancer. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 358, n. 11, p. 1148-1159, 2008.

FITZGIBBONS, P. L. *et al.* Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, Northfield, v. 124, n. 7, p. 966-978, 2000.

FONG, P. C., *et al.* Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from *BRCA* mutation cancer. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 361, n. 2, p. 123-134, 2009.

FUTREAL, P. A. *et al.* *BRCA1* mutations in primary breast and ovarian carcinomas. **Science**, Washington, v. 266, n. 5182, p. 120-122, 1994.

GARCIA, M., *et al.* **Global cancer facts and figures 2007**. Atlanta, GA: American Cancer Society, 2007. Disponível em:  
<[http://www.cancer.org/downloads/STT/Global\\_Facts\\_and\\_Figures\\_2007\\_rev2.pdf](http://www.cancer.org/downloads/STT/Global_Facts_and_Figures_2007_rev2.pdf)>. Acesso em: 10/10/2009.

GATALICA, Z., *et al.* The expression of FHIT protein is related inversely to disease progression in patients with breast carcinoma. **Cancer**, New York, v. 88, n. 6, p. 1378-1383, 2000.

GENOME DATABASE. Bethesda: National Center for Biotechnology Information (NCBI), 2006-2009. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genome>>. Acesso em: 26/7/2009.

GINESTIER, C. *et al.* Loss of FHIT protein expression is a marker of adverse evolution in good prognosis localized breast cancer. **Int. J. Cancer**, New York, v. 107, n. 5, p. 854-862, 2003.

GLOVER, T. W.; STEIN, C. K. Chromosome breakage and recombination at fragile sites. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v. 43, n. 3, p. 265-273, 1988.

GOLDHIRSCH, A. *et al.* Meeting highlights: international consensus panel on the treatment of primary breast cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, Cary, v. 90, n. 21, p. 1601-1608, 1998.

GOWN, A. E. Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. **Mod. Pathol.**, Baltimore, v. 21, suppl. 8, p. 8-15, 2008.

GREENE, F. L. *et al.* **AJCC Cancer Staging Manual**. 6<sup>th</sup> ed. New York: Springer, 2002.

GULER, G. *et al.* Fragile histidine triad protein, WW domain-containing oxidoreductase protein Wwox, and activator protein 2gamma expression levels correlate with basal phenotype in breast cancer. **Cancer**, New York, v. 115, n. 4, p. 899-908, 2009.

HABER, D. Roads leading to breast cancer. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 343, n. 21, p. 1566-1568, 2000.

HALL, J. M. *et al.* Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. **Science**, Washington, v. 250, n. 4988, p. 1684-1689, 1990.

HANBY, A. M. *et al.* Association between loss of heterozygosity of *BRCA1* and *BRCA2* and morphological attributes of sporadic breast cancer. **Int. J. Cancer**, New York, v. 88, n. 2, p. 204-208, 2000.

HARVEY, J. M. *et al.* Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. **J. Clin. Oncol.**, New York, v. 17, n. 5, p. 1474-1481, 1999.

HATSCHBACH, S. B. B. *et al.* Tratamento cirúrgico do câncer de mama: experiência de 27 anos do Hospital Erasto Gaertner. **Rev. Bras. Mastol.**, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 25-29, 2003.

HENRY, N. L; HAYES, D. F. Use and abuses of tumor markers in the diagnosis, monitoring, and treatment of primary and metastatic breast cancer. **Oncologist**, Dayton, v. 11, n. 6, p. 541-552, 2006.

HUEBNER, K., *et al.* The role of the FHIT/FRA3B locus in cancer. **Annu. Rev. Genet.**, Palo Alto, v. 32, p. 7-31, 1998.

HUEBNER, K.; CROCE, C. M. *FRA3B* and other common fragile sites: the weakest links. **Nat. Rev. Cancer**, London, v. 1, n. 3, p. 214-221, 2001.

HUEBNER, K.; CROCE, C. M. Cancer and the *FRA3B/FHIT* fragile locus: it's a HIT. **Br. J. Cancer**, London, v. 88, n. 10, p. 1501-1506, 2003.

HUIPING, C. *et al.* Analysis of the fragile histidine triad (*FHIT*) gene in lobular breast cancer. **Eur. J. Cancer**, Oxford, v. 36, n. 12, p. 1552-1557, 2000.

IBECS. São Paulo: Bireme/OPAS/OMS, 1967-2009. Disponível em: <<http://www.bireme.br/php/index.php>>. Acesso em: 4/7/2009.

INCA. **Estimativa 2008 - Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: CEDC, 2007. Disponível em: <http://www.inca.org.br/estimativa/2008>. Acesso em: 1/7/2009.

INGVARSSON, S. *et al.* Alterations of the *FHIT* gene in breast cancer: association with tumor progression and patient survival. **Cancer Detec. Prev.**, Oxford, v. 25, n. 3, p. 292-298, 2001.

JANATOVA, M. *et al.* Novel somatic mutations in the *BRCA1* gene in sporadic breast tumors. **Hum. Mutat.**, New York, v. 25, n. 3, p. 319, 2005.

JOHNSON, S. M.; SHAW, J. A.; WALKER, R. A. Sporadic breast cancer in young women: prevalence of loss of heterozygosity at *p53*, *BRCA1* and *BRCA2*. **Int. J. Cancer**, New York, v. 98, n. 2, p. 205-209, 2002.

KALIKIN, L. M. *et al.* Detailed deletion analysis of sporadic breast tumors defines an interstitial region of allelic loss on 17q25. **Genes Chromosomes Cancer**, New York, v. 17, n. 1, p. 64-68, 1996.

KEYOMARSI, K. *et al.* Cyclin E and survival in patients with breast cancer. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 347, n. 20, p. 1566-1575, 2002.

KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and Caretakers. **Nature**, London, v. 386, n. 6627, p. 761-763, 1997.

KNUDSON JUNIOR, A. G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 68, n. 4, p. 820-823, 1971.

LEE, W-H.; BOYER, T. G. *BRCA1* and *BRCA2* in breast cancer. **Lancet Suppl.**, London, v. 358, p. 5, 2001.

LEREBOURS, F.; LIDEREAU, R. Molecular alterations in sporadic breast cancer. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, Amsterdam, v. 44, n. 2, p. 121-141, 2002.

LEVAN, A. Some current problems of cancer cytogenetics. **Hereditas**, Lund, v. 57, n. 3, p. 343-345, 1967.

LEVITT, N. C.; HICKSON, I. D. Caretaker tumor suppressor genes that defend genome integrity. **Trends Mol. Med.**, Oxford, v. 8, n. 4, p. 179-186, 2002.

LI, C. I.; DALING, J. R.; MALONE, K. E. Incidence of invasive breast cancer by hormone receptor status from 1992 to 1998. **J. Clin. Oncol.**, New York, v. 21, n. 1, p. 28-34, 2003.

LILACS. São Paulo: Bireme/OPAS/OMS, 1967-2009. Disponível em: <<http://www.bireme.br/php/index.php>>. Acesso em: 4/7/2009.

MA, X., *et al.* The *HOXB13:IL17BR* expression index is a prognostic factor in early-stage breast cancer. **J. Clin. Oncol.**, New York, v. 24, n. 28, p. 4611-4619, 2006.

McSHANE, L. M., *et al.* REporting recommendations for tumor MARKer prognostic studies (REMARK). **Breast Cancer Res. Treat.**, Boston, v. 100, n. 2, p. 229-235, 2006.

MALKIN, D. *et al.* Germ line *p53* mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas and other neoplasms. **Science**, Washington, v. 250, n. 4985, p. 1233-1238, 1990.

MATROS, E. *et al.* *BRCA1* promoter methylation in sporadic breast tumors: relationship to gene expression profiles. **Breast Cancer Res. Treat.**, Boston, v. 91, n. 2, p. 179-186, 2005.

MEDLINE. Bethesda: PubMed Home. U.S. National library of medicine, 1948-2009. Disponível em: [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/). Acesso em: 26/7/2009.

MENG, F. *et al.* Involvement of human microRNA in growth and response do chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 130, n. 7, p. 2113-2129, 2006.

MIKI, Y. *et al.* A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1*. **Science**, Washington, v. 266, n. 5182, p. 66-71, 1994.

MIYAKIS, S.; SPANDIDOS, D. A. Allelic loss in breast cancer. **Cancer Detect. Prev.**, Oxford, v. 26, n. 6, p. 426-434, 2002.

MUELLER, C. R.; ROSKELLEY, C. D. Regulation of *BRCA1* expression and its relationship to sporadic breast cancer. **Breast Cancer Res.**, London, v. 5, n. 1, p. 45-52, 2003.

NAGAI, M. A. *et al.* Detailed deletion mapping of chromosome segment 17q12-21 in sporadic breast tumors. **Gene Chromosomes Cancer**, New York, v. 11, n. 1, p. 58-62, 1994.

NEGRINI, M. *et al.* The *FHIT* gene at 3p14.2 is abnormal in breast carcinomas. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 56, n. 14, p. 3173-3179, 1996.

OHTA, M. *et al.* The human *FHIT* gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. **Cell**, Cambridge, v. 84, n. 4, p. 587-597, 1996.

PAIK, S. *et al.* A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node negative breast cancer. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 351, n. 27, p. 2817-2826, 2004.

PAPA, S. *et al.* Identification of a possible somatic *BRCA1* mutation affecting translation efficiency in an early-onset sporadic breast cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, Cary, v. 90, n. 13, p. 1011-1012, 1998.

PEROU, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, London, v. 406, n. 6797, p. 747-752, 2000.

RAKHA, E. A. *et al.* Expression of *BRCA1* protein in breast cancer and its prognostic significance. **Hum. Pathol.**, Philadelphia, v. 39, n. 6, p. 857-865, 2008.

RIO, P. G. *et al.* Loss of heterozygosity of *BRCA1*, *BRCA2*, and *ATM* genes in sporadic invasive ductal breast carcinoma. **Int. J. Oncol.** Athens, v. 13, n. 4, p. 849-853, 1998.

ROSEN, P. P. Tumor emboli in intramammary lymphatics in breast carcinoma: pathologic criteria for diagnosis and clinical significance. **Pathol. Annu.**, New York, v. 18, pt. 2, p. 215-232, 1983.

ROSS, J. S.; FLETCHER, J. A. The *HER-2/neu* oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor and target for therapy. **Stem Cells**, Basel, v. 16, n. 6, p. 413-428, 1998.

RUFFNER, H. *et al.* *BRCA1* is phosphorylated at serine 1497 in vivo at a cyclin-dependent kinase 2 phosphorylation site. **Mol. Cell Biol.**, Washington, v. 19, n. 7, p. 4843-4854, 1999.

SANTOS, S. C. L. *et al.* Loss of heterozygosity of the *BRCA1* and *FHIT* genes in patients with sporadic breast cancer from southern Brazil. **J. Clin. Pathol.**, London, v. 57, n. 4, p. 374-377, 2004.

SciELO. São Paulo: Bireme/OPAS/OMS, 1967-2009. Disponível em: <<http://www.bireme.br/php/index.php>>. Acesso em: 4/7/2009.

SEER. Surveillance, Epidemiology and End Results. Bethesda. U.S. National library of medicine, 1973-2006. Disponível em: <http://www.cancer.gov/> Acesso em: 31/7/2009.

SEERY, L. T. *et al.* *BRCA1* expression levels predict distant metastasis of sporadic breast cancers. **Int. J. Cancer**, New York, v. 84, n. 3, p. 258-262, 1999.

SILVA, J. M. *et al.* Loss of heterozygosity in *BRCA1* and *BRCA2* markers and high-grade malignancy in breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.**, Boston, v. 53, n. 1, p. 9-17, 1999.

SINGLETARY, S. E.; SENER, S. F. Breast cancer staging: revisions for the sixth edition of the American Joint Committee on cancer staging manual. In: SINGLETARY, S. E.; ROBB, G. L.; HORTOBAGYI, G. N. **Advanced therapy of breast disease**. Houston: BC Decker inc, 2004. p. 175-180.

SOTIRIOU, C; PUSZTAI, L. Gene-expression signatures in breast cancer. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 360, n. 8, p. 790-800, 2009.

TEIXEIRA, M. R.; PANDIS, N.; HEIM, S. Cytogenetic clues to breast carcinogenesis. **Genes Chromosomes Cancer**, New York, v. 33, n. 1, p. 1-16, 2002.

THOMPSON, M. E. *et al.* Decreased expression of *BRCA1* accelerates growth and is often present during sporadic breast cancer progression. **Nat. Genet.**, New York, v. 9, n. 4, p. 444-450, 1995.

THOR, A. D. Advances in therapy: prognostic factors in breast cancer. In: SINGLETARY, S. E.; ROBB, G. L.; HORTOBAGYI, G. N. **Advanced therapy of breast disease**. Houston: BC Decker inc., 2004. p. 181-188.

TURNER, B. C. *et al.* The Fragile Histidine Triad/Common Chromosome Fragile Site 3B locus and repair-deficient cancers. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 62, n. 14, p. 4054-4060, 2002.

TURNER, N.; TUTT, A.; ASHWORTH, A. Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers. **Nat. Rev. Cancer**, London, v. 4, n. 10, p. 814-819, 2004.

VAN DE VIJVER, M. J. *et al.* A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 347, n. 25, p. 1999-2009, 2002.

VAN DER LOOIJ, M. *et al.* A sporadic breast tumor with a somatically acquired complex genomic rearrangement in *BRCA1*. **Gene Chromosomes Cancer**, New York, v. 27, n. 3, p. 295-302, 2000.

VAN STEENIS, H. Chromosomes and cancer. **Nature**, London, v. 209, n. 5025, p. 819-821, 1966.

WEINBERG, R. A. Tumor suppressor genes. **Science**, Washington, v. 254, n. 5035, p. 1138-1145, 1991.

WOOSTER, R.; WEBER, B. L. Breast and ovarian cancer. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 348, n. 23, p. 2339-2347, 2003.

YANG, Q. *et al.* Clinicopathological significance of fragile histidine triad transcription protein expression in breast carcinoma. **Clin. Cancer Res.**, Denville, v. 7, n. 12, p. 3869-3873, 2001.

ZÖCHBAUER-MÜLLER, S. *et al.* 5' CpG island methylation of the *FHIT* gene is correlated with loss of gene expression in lung and breast cancer. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 61, n. 9, p. 3581-3585, 2001.



## DOCUMENTOS CONSULTADOS

BECHARA, E. **O que muda com o novo acordo ortográfico**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 2008.

FARAH, S. B. **DNA: Segredos e Mistérios**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2007.

MICHAELIS dicionário escolar: inglês-português. São Paulo: Melhoramentos, 2001.

SPECTOR, N. **Manual para a redação de teses, projetos de pesquisa e artigos científicos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

SPLENDORE, A. Para que existem as regras de nomenclatura genética? **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, Rio de Janeiro, vol. 27, n. 2, p. 148-152, 2005.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de Bibliotecas. **Citações e notas de rodapé**. 2. ed. Curitiba: Editora UFPR, 2007. (Normas para apresentação de documentos científicos, 3).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de Bibliotecas. **Redação e editoração**. 2. ed. Curitiba: Editora UFPR, 2007. (Normas para apresentação de documentos científicos, 9).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de Bibliotecas. **Referências**. 2. ed. Curitiba: Editora UFPR, 2007. (Normas para apresentação de documentos científicos, 4).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de Bibliotecas. **Teses, dissertações, monografias e outros trabalhos acadêmicos**. 2. ed. Curitiba: Editora UFPR, 2007. (Normas para apresentação de documentos científicos, 2).

## APÊNDICE

APÊNDICE 1 – REGIMES DE QUIMIOTERAPIA.....	82
APÊNDICE 2 – CARACTERÍSTICAS DAS 82 PACIENTES AVALIADAS.....	83
APÊNDICE 3 – CARACTERÍSTICAS DO TRATAMENTO.....	85
APÊNDICE 4 – EVOLUÇÃO CLÍNICA DAS 82 PACIENTES AVALIADAS.....	87
APÊNDICE 5 – DETERMINAÇÃO DA LOH NOS SEIS MARCADORES.....	88

## APÊNDICE 1 - REGIMES DE QUIMIOTERAPIA

<b>Esquema</b>	<b>Descrição do tratamento</b>
AC x 4*	Adriplastina, 60 mg/m <sup>2</sup> iv. no dia 1 Ciclofosfamida, 600 mg/m <sup>2</sup> iv. no dia 1
CMF x 6*	Ciclofosfamida, 500 mg/m <sup>2</sup> iv., dias 1 e 8 (dose total/ciclo, 1000 mg/m <sup>2</sup> ) Metotrexate, 40 mg/m <sup>2</sup> iv., dias 1 e 8 (dose total/ciclo, 80 mg/m <sup>2</sup> ) Fluorouracil, 500 mg/m <sup>2</sup> iv., dias 1 e 8 (dose total/ciclo, 1000 mg/m <sup>2</sup> )
FAC x 6*	Fluorouracil, 500 mg/m <sup>2</sup> iv., dias 1 e 8 (dose total/ciclo, 1000 mg/m <sup>2</sup> ) Adriplastina, 30 mg/m <sup>2</sup> iv., dias 1 e 8 (dose total/ciclo, 60 mg/m <sup>2</sup> ) Ciclofosfamida, 500 mg/m <sup>2</sup> iv., dias 1 e 8 (dose total/ciclo, 1000 mg/m <sup>2</sup> )

\* Número de ciclos

NOTA: Os ciclos foram repetidos a cada 21 dias para o regime AC e a cada 28 dias para o CMF e FAC; iv. = intravenoso.

## APÊNDICE 2 – CARACTERÍSTICAS DAS 82 PACIENTES AVALIADAS

Nº	Idade	Tipo h.	Tama.	Axila	Estád.	Grau	IAL	RE	RP	HER2	LOH FHIT	LOH BRCA1
1	85	ductal	>5	N	III	3	A	N	N	N	P	P
2	59	ductal	3,5	P	II	3	P	P	P	N	P	A
3	46	ductal	5	P	II	2	P	P	P	N	P	P
4	45	ductal	3	N	II	2	P	P	P	N	A	A
5	59	ductal	3,5	N	II	3	P	ND	ND	ND	A	P
6	57	ductal	>5	P	III	3	P	N	N	N	P	P
7	40	ductal	5	N	II	3	P	N	N	P	A	P
8	80	ductal	3	N	II	2	P	N	N	N	P	P
9	48	ductal	3	N	II	1	A	P	N	N	P	P
10	45	ductal	3	N	II	3	A	P	P	N	A	A
11	48	ductal	3	N	II	2	P	N	N	N	A	A
12	66	ductal	3	P	II	2	P	ND	ND	ND	P	P
13	54	ductal	3	N	II	2	A	ND	ND	ND	A	P
14	41	ductal	>5	P	III	3	P	N	N	P	P	A
15	29	ductal	4	P	II	2	P	P	P	N	P	A
16	62	ductal	1,5	N	I	1	A	P	P	N	A	A
17	35	ductal	4	P	II	3	P	P	P	N	P	P
18	25	ductal	2	P	II	3	P	P	P	P	A	P
19	40	ductal	5	P	II	2	P	P	P	N	A	P
20	79	ductal	2	N	II	1	A	P	P	N	A	A
21	41	ductal	>5	P	III	3	P	N	N	N	P	P
22	45	ductal	3	P	II	3	P	N	N	N	NI	A
23	83	ductal	>5	P	III	3	P	N	N	N	P	P
24	54	ductal	0,8	N	I	3	P	P	P	N	P	A
25	59	ductal	3,5	N	II	3	P	N	N	P	P	A
26	40	ductal	>5	P	III	3	P	N	N	P	A	NI
27	51	ductal	3	N	II	1	A	P	P	N	A	P
28	70	ductal	3,5	N	II	3	P	N	N	N	A	A
29	85	ductal	2	N	II	1	A	N	N	N	A	A
30	33	ductal	3,5	P	III	3	A	N	N	N	P	NI
31	68	cribrif.	1,5	N	I	1	A	P	P	N	A	A
32	38	ductal	>5	P	III	3	P	P	P	N	P	P
33	70	ductal	2	P	II	1	A	P	P	N	A	NI
34	47	ductal	2	N	II	2	A	N	N	P	P	P
35	47	ductal	3	N	II	1	A	P	P	ND	A	A
36	60	papilíf.	2	N	I	1	A	P	P	ND	A	A
37	69	ductal	>5	P	III	2	P	ND	ND	ND	A	A
38	68	ductal	4	N	III	2	A	N	N	N	A	NI
39	76	ductal	3	N	II	3	A	P	P	N	P	P
40	43	ductal	4	P	III	2	P	P	P	N	P	P
41	68	papilíf.	4	N	II	1	A	P	P	N	P	A

Continua

## APÊNDICE 2 – CARACTERÍSTICAS DAS 82 PACIENTES AVALIADAS

Nº	Idade	Tipo h	Tama	Axila	Estád.	Grau	IAL	RE	RP	HER2	LOH <i>FHIT</i>	LOH <i>BRCA1</i>
42	37	ductal	1,1	N	I	1	A	P	P	P	A	P
43	44	ductal	1,5	N	I	1	A	P	P	N	P	NI
44	48	ductal	3	P	II	2	P	P	P	N	A	NI
45	36	ductal	4	N	II	1	P	P	P	P	NI	A
46	39	ductal	2,8	P	II	1	P	P	P	ND	A	NI
47	50	ductal	4	N	II	3	P	N	N	P	P	P
48	37	medul.	3	N	II	3	A	N	N	N	A	P
49	43	ductal	4	P	II	1	P	P	P	N	A	A
50	41	ductal	5	N	II	3	A	N	N	N	P	P
51	40	ductal	1	N	I	1	A	P	P	N	A	A
52	48	mucin.	4	P	II	1	A	P	P	N	P	P
53	35	ductal	1,8	N	I	1	A	P	P	N	P	A
54	46	ductal	3	N	II	3	P	P	N	N	P	P
55	65	ductal	1,5	N	I	1	A	P	P	N	P	A
56	79	ductal	3	P	II	3	P	P	P	N	A	A
57	35	ductal	4	P	II	3	P	P	P	N	A	P
58	28	ductal	3	P	II	2	P	P	P	N	P	A
59	59	ductal	5	P	III	2	A	P	P	N	A	A
60	61	ductal	>5	P	III	3	P	P	P	N	P	P
61	43	ductal	4	P	II	3	P	P	P	N	P	P
62	53	ductal	4	P	II	2	P	P	P	N	P	P
63	61	ductal	5	N	III	3	P	P	P	N	A	A
64	76	ductal	4	N	II	3	P	P	P	N	P	NI
65	59	lobular	1	N	I	1	A	P	N	N	A	A
66	41	ductal	3	N	II	2	A	P	P	N	A	A
67	52	ductal	5	N	III	2	P	P	P	N	A	P
68	40	ductal	>5	N	III	3	P	N	N	N	P	P
69	54	lobular	3	N	III	2	A	P	P	N	A	A
70	56	ductal	1,5	N	I	1	A	P	P	N	A	A
71	47	ductal	0,8	N	I	2	P	P	P	ND	A	A
72	64	ductal	1,5	P	II	2	P	P	P	N	P	A
73	44	ductal	>5	P	III	3	P	N	N	P	P	P
74	61	ductal	2,5	N	II	2	P	N	N	N	A	P
75	60	ductal	3	N	II	2	A	P	P	N	A	A
76	50	ductal	>5	P	III	2	P	P	P	N	A	A
77	50	ductal	2	P	II	2	P	P	P	N	P	A
78	31	ductal	5	P	III	3	P	N	N	P	A	P
79	62	ductal	3	N	II	2	P	P	P	N	P	P
80	40	ductal	2,5	P	II	3	P	P	P	N	A	P
81	39	ductal	2	P	II	2	P	N	N	P	A	P
82	40	ductal	5	P	III	3	P	N	N	P	P	P

## Conclusão

NOTA: Nº: número da paciente; Idade: em anos; Tipo h: tipo histológico; Tama: tamanho (cm); Axila (linfonodos axilares): N = negativa, P = positiva; Estád: estágio clínico TNM; Grau: grau histológico; IAL (invasão angiolinfática): P = presente, A = ausente ; RE (receptor de estrogênio): P = positivo, N = negativo, ND: não determinado; RP (receptor de progesterona) P = positivo, N = negativo, ND: não determinado; HER2 (superexpressão da proteína HER2): P = positivo, N = negativo, ND: não determinado; LOH *FHIT* (perda da heterozigose do gene *FHIT*): P = presente, A = ausente, NI: não informativo; LOH *BRCA1* (perda da heterozigose do gene *BRCA1*): P = presente, A = ausente, NI = não informativo.

## APÊNDICE 3 – CARACTERÍSTICAS DO TRATAMENTO

Nº	Cirurgia	Quimioterapia	Radioterapia	Tto. hormonal
1	MRM	CMF	Não	Não
2	MRM	CMF	Sim	Tamoxifeno
3	MRM	CMF	Sim	Tamoxifeno
4	MRM	AC	Sim	Tamoxifeno
5	MRM	CMF	Não	Tamoxifeno
6	MRM	FAC	Sim	Não
7	MRM	FAC	Não	Não
8	CC	Não	Sim	Não
9	MRM	CMF	Sim	Tamoxifeno
10	CC	AC	Sim	Tamoxifeno
11	CC	AC	Sim	Não
12	CC	CMF	Sim	Tamoxifeno
13	MRM	CMF	Não	Tamoxifeno
14	MRM	FAC	Sim	Não
15	CC	FAC	Sim	Tamoxifeno
16	CC	Não	Sim	Tamoxifeno
17	MRM	CMF	Sim	Tamoxifeno
18	MRM	AC	Sim	Tamoxifeno
19	MRM	AC	Sim	Tamoxifeno
20	MRM	Não	Não	Tamoxifeno
21	MRM	AC	Sim	Não
22	MRM	AC	Sim	Não
23	MRM	AC	Sim	Não
24	CC	CMF	Sim	Tamoxifeno
25	MRM	AC	Não	Não
26	MRM	FAC	Sim	Não
27	MRM	AC	Não	Tamoxifeno
28	MRM	CMF	Não	Não
29	MRM	Não	Sim	Tamoxifeno
30	MRM	AC	Sim	Não
31	CC	Não	Sim	Tamoxifeno
32	MRM	AC	Sim	Tamoxifeno
33	CC	AC	Sim	Tamoxifeno
34	CC	CMF	Sim	Não
35	MRM	AC	Sim	Tamoxifeno
36	CC	AC	Sim	Tamoxifeno
37	MRM	AC	Sim	Não
38	MRM	CMF	Sim	Não
39	MRM	Não	Sim	Tamoxifeno
40	MRM	AC	Sim	Tamoxifeno
41	MRM	CMF	Sim	Tamoxifeno
42	CC	CMF	Sim	Tamoxifeno
43	CC	CMF	Sim	Tamoxifeno
44	CC	AC	Sim	Tamoxifeno
45	CC	CMF	Sim	Tamoxifeno
46	MRM	FAC	Sim	Tamoxifeno

Continua

## APÊNDICE 3 – CARACTERÍSTICAS DO TRATAMENTO

Nº	Cirurgia	Quimioterapia	Radioterapia	Tto. hormonal
47	CC	CMF	Sim	Não
48	CC	CMF	Sim	Não
49	CC	AC	Sim	Tamoxifeno
50	MRM	AC	Sim	Não
51	CC	AC	Sim	Tamoxifeno
52	MRM	FAC	Não	Tamoxifeno
53	CC	AC	Sim	Tamoxifeno
54	CC	AC	Sim	Tamoxifeno
55	CC	Não	Sim	Tamoxifeno
56	CC	CMF	Sim	Anastrozol
57	CC	AC	Sim	Tamoxifeno
58	CC	AC	Sim	Tamoxifeno
59	MRM	AC	Sim	Tamoxifeno
60	CC	AC	Sim	Tamoxifeno
61	MRM	FAC	Sim	Tamoxifeno
62	MRM	AC	Sim	Tamoxifeno
63	CC	AC	Sim	Tamoxifeno
64	CC	CMF	Sim	Tamoxifeno
65	CC	Não	Sim	Tamoxifeno
66	MRM	AC	Sim	Tamoxifeno
67	CC	AC	Sim	Tamoxifeno
68	CC	AC	Sim	Não
69	MRM	FAC	Não	Tamoxifeno
70	CC	Não	Sim	Tamoxifeno
71	CC	Não	Sim	Tamoxifeno
72	CC	CMF	Sim	Tamoxifeno
73	CC	AC	Sim	Não
74	MRM	AC	Sim	Não
75	CC	CMF	Sim	Tamoxifeno
76	CC	AC	Sim	Tamoxifeno
77	CC	AC	Sim	Tamoxifeno
78	CC	AC	Sim	Não
79	CC	CMF	Sim	Tamoxifeno
80	CC	AC	Sim	Tamoxifeno
81	CC	AC	Sim	Não
82	CC	AC	Sim	Não

## Conclusão

NOTA: Nº: número da paciente; Cirurgia: MRM = mastectomia radical modificada, CC = cirurgia conservadora; CMF: ciclofosfamida + metotrexate + fluorouracil, AC: adriplastina + ciclofosfamida, FAC: fluorouracil + adriplastina + ciclofosfamida.

## APÊNDICE 4 – EVOLUÇÃO CLÍNICA DAS 82 PACIENTES AVALIADAS

Nº	TS	Evolução	Metástase	Nº	TS	Evolução	Metástase
1	16	óbito	pulmão	42	64	SED	
2	64	SED		43	60	SED	
3	60	óbito	osso	44	60	SED	
4	64	SED		45	66	SED	
5	60	SED		46	66	SED	
6	48	óbito	fígado	47	63	SED	
7	21	óbito	fígado	48	48	SED	
8	44	SED		49	48	SED	
9	50	SED		50	55	SED	
10	60	SED		51	48	SED	
11	52	SED		52	48	SED	
12	34	óbito	osso/fígado	53	56	SED	
13	36	óbito	osso	54	56	SED	
14	24	óbito	pulmão	55	40	SED	
15	40	óbito	osso	56	38	SED	
16	72	SED		57	40	SED	
17	50	óbito	osso/pulmão	58	41	SED	
18	52	óbito	osso/pulmão	59	50	SED	
19	31	óbito	pericárdio	60	38	viva c/ dça	osso
20	60	SED		61	52	SED	
21	76	SED		62	30	óbito	fígado
22	35	óbito	cérebro	63	41	óbito	osso
23	10	óbito	plastrão/osso	64	45	SED	
24	66	SED		65	44	SED	
25	72	SED		66	42	SED	
26	17	óbito	fígado	67	37	SED	
27	72	SED		68	38	SED	
28	72	SED		69	36	viva c/ dça	osso
29	68	SED		70	38	SED	
30	68	SED		71	38	SED	
31	44	SED		72	40	SED	
32	29	óbito	osso/fígado	73	24	óbito	fígado
33	60	SED		74	56	óbito	cérebro
34	44	SED		75	39	SED	
35	60	SED		76	39	SED	
36	56	SED		77	42	SED	
37	24	óbito	fígado	78	43	SED	
38	66	SED		79	40	SED	
39	66	SED		80	42	SED	
40	60	viva c/ dça	osso	81	42	SED	
41	63	SED		82	44	SED	

NOTA: Nº: número da paciente; TS: tempo de seguimento (meses); SED: sem evidência de doença em atividade.



## APÊNDICE 5 – DETERMINAÇÃO DA LOH NOS SEIS MARCADORES

Nº	D3S1300			D3S4103			D3S1234			D17S791			D17S1323			D17S1322		
	Ho	He	L	Ho	He	L	Ho	He	L	Ho	He	L	Ho	He	L	Ho	He	L
1			X			X	X			X					X			X
2		X		X					X		X		X			X		
3			X			X			X	X					X	X		
4		X			X			X			X			X			X	
5		X		X			X			X					X	X		
6	X				X				X			X	X			X		
7		X		X			X				X		X				X	
8		X		X					X		X				X			X
9			X	X			X				X	X					X	
10		X			X		X				X		X			X		
11		X			X		X				X		X				X	
12	X			X					X			X		X			X	
13		X			X			X		X			X					X
14			X		X			X		X			X			X		
15			X			X		X		X			X			X		
16		X			X			X		X			X			X		
17			X			X		X			X		X			X		
18		X			X		X			X					X		X	
19		X			X			X			X		X					X
20		X			X			X			X			X			X	
21			X	X					X		X				X	X		
22	X			X			X			X			X			X		
23	X				X				X					X				X
24			X	X				X		X			X			X		
25		X		X				X		X			X			X		
26	X			X				X		X			X			X		
27	X				X			X			X		X					X
28		X			X		X			X				X			X	
29		X			X		X			X				X			X	
30	X			X				X		X			X			X		
31		X			X		X			X			X			X		
32		X			X			X		X				X			X	
33		X		X				X		X			X			X		
34	X					X	X			X				X		X		X
35		X			X		X			X			X			X		
36	X				X		X			X			X			X		
37		X			X			X		X			X			X		
38	X			X				X		X			X			X		
39			X	X				X			X		X		X		X	
40			X		X			X			X		X			X		X
41	X			X					X		X			X		X		X

Continua

## APÊNDICE 5 – DETERMINAÇÃO DA LOH NOS SEIS MARCADORES

Nº	D3S1300			D3S4103			D3S1234			D17S791			D17S1323			D17S1322		
	Ho	He	L	Ho	He	L	Ho	He	L	Ho	He	L	Ho	He	L	Ho	He	L
42		X			X			X				X		X			X	
43			X		X			X		X			X				X	
44		X		X			X			X			X				X	
45	X			X			X				X		X				X	
46		X		X			X			X			X				X	
47	X				X				X			X	X				X	
48		X			X		X					X	X					X
49		X			X			X			X			X			X	
50		X				X	X			X			X					X
51	X				X			X			X			X			X	
52			X		X		X					X		X			X	
53			X		X		X				X		X				X	
54		X		X					X			X			X			X
55			X		X			X			X			X			X	
56		X			X			X			X		X				X	
57	X			X				X				X	X					X
58	X					X			X			X		X				X
59		X		X			X			X			X				X	
60			X			X			X			X			X			X
61			X		X			X				X			X		X	
62	X					X	X					X			X		X	
63		X			X			X				X		X			X	
64	X					X	X			X			X				X	
65	X				X			X				X		X			X	
66		X			X			X				X		X			X	
67	X				X		X			X			X					X
68			X	X					X			X			X			X
69		X			X			X				X		X			X	
70		X			X			X				X		X			X	
71		X			X			X				X		X			X	
72		X			X				X			X		X			X	
73			X			X	X					X			X			X
74	X				X			X				X		X				X
75		X			X		X					X		X			X	
76		X			X			X				X		X			X	
77			X		X			X				X		X			X	
78		X			X		X					X			X			X
79		X			X				X			X	X				X	
80		X			X			X				X			X		X	
81	X				X			X		X				X				X
82		X				X		X				X	X				X	

Conclusão

NOTA: Ho: homozigoto; He: heterozigoto; L: LOH

**ANEXO****PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA MÉDICA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS – UFPR**

Curitiba, 04 de setembro de 2007.

Ilmo (a) Sr. (a)  
**Emerson Wander Silva Soares**  
Nesta

Prezado Pesquisador:

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "PERDA DA HETEROZIGOSE DOS GENES BRCA1 E FHIT COMO FATOR PROGNÓSTICO EM PACIENTES COM CANCER DE MAMA, foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 27 de março de 2007. O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e demais, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

**CAAE: 0048.0.208.000-07**  
**Registro CEP: 1381.045/2007-03**

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

**Data para entrega do primeiro relatório: 04 de março de 2008.**

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Renato Tambara Filho".

**Renato Tambara Filho**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR